

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Keily Lucienne Fonseca Silva

Orientador: Prof. Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires

Co-orientador: Prof. Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga



VILA REAL, 2013

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Keily Lucienne Fonseca Silva

Orientador: Prof. Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires

Co-orientador: Prof. Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga



VILA REAL, 2013

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Keily Lucienne Fonseca Silva

Orientador: Prof. Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires

Co-orientador: Prof. Doutora Felisbina Luísa Pereira Guedes Queiroga

Composição do Júri:

VILA REAL, 2013

“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais volta ao seu tamanho inicial”

ALBERT EINSTEIN

“As Doutrinas expostas no presente trabalho
são da exclusiva responsabilidade do autor”

Aos meus pais e irmãos

RESUMO

Em cães, os tumores melanocíticos apresentam uma biologia extremamente diversificada e o comportamento altamente agressivos. Com o objectivo de estudar o índice proliferativo nos tumores melanocíticos caninos e comparar esses índices com a localização e os critérios histopatológicos classicamente associados à agressividade, foram analisados 48 tumores melanocíticos sendo 9 melanocitomas e 39 melanomas. De cada animal foram registados os dados referentes ao animal (idade, sexo e raça) e os dados referentes ao tumor (localização e tamanho) tendo sido feita, posteriormente, uma avaliação das lesões na coloração de rotina com hematoxilina-eosina (HE), relativamente aos parâmetros histopatológicos definidos, nomeadamente o tipo de células, actividade juncional, atipia nuclear, Infiltrado linfoplasmocitário necrose, células gigantes, proliferação intraepitelial, ulceração, estroma e as células tumorais intravasculares.

O índice de proliferação marcada pelo Ki-67 foi avaliado por meio da imunohistoquímica enquanto o índice mitótico foi avaliada pela coloração de HE com branqueamento da melanina.

Com esse estudo pudemos verificar que o índice proliferativo, determinado pela contagem de mitoses e pela marcação imunohistoquímica pelo Ki-67 variou significativamente entre tumores melanocíticos localizados na cavidade oral e cutânea, sendo que nos melanocitomas o índice proliferativo foi menor quando comparado com os melanomas. Também o índice proliferativo mostrou uma correlação significativa com a atipia nuclear e a Infiltrado linfoplasmocitário. O Ki-67 e o índice mitótico mostraram ser estatisticamente significativos tanto nos melanomas assim como nos tumores melanocíticos no geral, com o nível de significância de $P=0,026$ e $P=0,001$ respectivamente. Sendo assim, o estudo dos índices proliferativos pode ser bastante útil para o diagnóstico dos melanomas caninos, auxiliando o médico na escolha do melhor tratamento.

Palavras-chaves: Melanoma, Cães, Imunohistoquímica, Ki-67, IM.

ABSTRACT

The melanocytic tumors in dogs present a biology extremely diversified and a highly aggressive behavior. With the aim of studying the proliferative melanocytic index tumors in canines and comparing these rates with the location and histopathological criteria classically associated with aggressiveness 48 melanocytic tumors were analyzed; 9 melanocytomas and 39 melanomas. Each one of the animals was recorded with the appropriate data regarding it (age, gender, and race) and the data regarding the tumor (location and size). These records having been previously made, an evaluation of the lesions in routine staining with hematoxylin-eosin, in relation to histopathological parameters defined, and in particular the type of cells, junctional activity, nuclear atypia, necrosis, inflammation, cell proliferation, large intraepithelial, ulceration, stroma and the intravascular tumor cells followed.

The proliferation index marked by Ki-67 was evaluated by means of immunohistochemistry while the mitotic index was assessed by staining with HE bleaching of melanin.

With this study we can check that the proliferative index determined by counting mitoses and the immunohistochemical staining for the Ki-67 varied significantly between melanocytic tumors located in the oral cavity and skin, being that in the melanocytomas the proliferative index was much lower when compared with the melanomas. Also, the proliferative index showed a significant correlation with the nuclear atypia and the inflammation. The Ki-67 and the mitotic index showed to be statistically significant in both melanomas as well as in the melanocytic tumors in general, with the significant level of $P=0.026$ and $P=0.001$ respectively. Thus, the study of proliferative indices can be very useful for the diagnosis of canine melanomas and assisting the physician in choosing the best treatment.

Key words: Melanoma, Dogs, Immunohistochemistry, Ki-67, IM.

ÍNDICE GERAL

Resumo	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Índice de figuras	vii
Índice de quadros	viii
Siglas e abreviaturas	ix
Agradecimentos	x
1. Introdução	1
1.1. Tumores melanocíticos.....	1
1.2. Tumores melanocíticos em canídeos	2
1.2.1. Tumores melanocíticos orais.....	3
1.2.2. Tumores melanocíticos cutâneos.....	5
1.3. Diagnóstico	6
1.4. Tratamento	7
1.5. Proliferação celular	7
2. Objectivos	10
3. Material e Métodos	11
3.1. Material	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Avaliação clínica	11
3.2.2. Estudo histopatológico	11
3.2.3. Determinação do índice mitótico	12
3.2.4. Estudo imunohistoquímico	12
3.2.5. Determinação da fracção do crescimento pelo Ki-67.....	14
3.2.6. Análise estatística	14
4. Resultados.....	15
4.1. Avaliação clínica.....	15
4.2. Avaliação histopatológica.....	18
4.3. Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos	21
4.3.1. Índice mitótico.....	21
4.3.2. Índice Ki-67.....	21

4.4. Associação entre proliferação celular e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos.....	21
4.4.1. Associação entre a proliferação celular determinada pelo IM e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos	21
4.4.2. Associação entre a proliferação celular determinada pelo Ki-67 e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos	21
4.4.3. Relação entre o índice mitótico e o índice de proliferação do Ki-67 nos tumores melanocíticos caninos.....	26
4.5. Associação entre proliferação celular e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos.....	26
4.5.1. Associação entre a proliferação celular determinada pelo IM e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos.....	26
4.5.2. Associação entre a proliferação celular determinada pelo Ki-67 e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos.....	27
4.5.3. Relação entre o índice mitótico e o índice de proliferação do Ki-67 nos melanomas malignos caninos.....	29
5. Discussão.....	30
6. Conclusão.....	40
7. Bibliografia.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tumefação que corresponde a aumento do linfonodo regional que e encontra metastizado.....	4
Figura 2: Melanoma oral.....	4
Figura 3: Melanoma cutâneo canino.....	5
Figura 4: Distribuição racial pelos 2 grupos de lesões melanocíticas (SDR- sem raça defenida).....	16
Figura 5: Distribuição dos melanomas caninos por tamanho da lesão	16
Figura 6: Melanoma oral com acentuada atipia citonuclear, HE (400x).....	19
Figura 7: Melanoma oral com atipia acentuada, observando-se várias mitoses, algumas das quais atípicas. H&E (600x).....	19
Figura 8: Expressão de Ki-67 melanoma cutâneo (200x).....	24
Figura 9: Expressão de Ki-67 em melanocitoma cutâneo (400x).....	24
Figura 10: Expressão de Ki-67 em melanoma oral (600x).....	24

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Classificação histológica das amostras incluídas no estudo (n=48).....	15
Quadro 2: Variáveis clínicas e respectivas frequências absolutas e relativas.....	17
Quadro 3: Caracterização histopatológica das amostras em estudo.....	20
Quadro 4: índice de proliferação das amostras em estudo.....	21
Quadro 5: Associação entre o IM e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos.....	22
Quadro 6: Associação entre o Ki-67 e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos.....	25
Quadro 7: Relação entre os valores médios do Ki-67 e do IM- correlação de Pearson.....	26
Quadro 8: Associação entre o IM e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos.....	27
Quadro 9: Associação entre Ki-67 e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos.....	28
Quadro 10: Relação entre os valores médios do Ki-67 e do IM- correlação de Pearson.....	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

χ^2 – Teste Qui-quadrado

ANOVA – Análise de variância

CTI – Células Tumorais Intravasculares

DAB – Tetra-hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina

HPF– High Power Fields

HE – Hematoxilina-Eosina

H₂O₂– Peroxido de hidrogénio

H₂C₂O₄ – Ácido oxálico

IgG1– Imunoglobulina G1

IM –Índice mitótico

Ki-67 – proteína Ki-67 (Clone MIB-1; proteína estritamente associada à proliferação celular)

KDa – KiloDalton

KMnO₄ – Permanganato de potássio

MIB-1– New monoclonal antibody

®- Marca registada

ml – Mililitro

n – Número de amostras

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

p – Significância estatística

r – Coeficiente de correlação

RE – Retículo Endoplasmático

SPSS – *Statistical Pachage for the Social Sciences*

std.- Desvio padrão

SRD – Sem raça determinada

UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

W – Watts

μl – Microlitro

μm–Micrometro

AGRADECIMENTO

Ao concluir esta tese de mestrado não podia deixar de expressar o meu agradecimento a um conjunto de pessoas que tornaram possível a sua realização:

À Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires, pela competência com que orientou esta minha tese e o tempo que generosamente me dedicou, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos com paciência, compreensão e confiança.

À Professora Doutora Felisbina Luísa Queiroga, o meu muito obrigado por ter aceitado a árdua tarefa de me orientar e guiar nesta importante etapa da minha vida. Agradeço a simpatia e a disponibilidade que sempre mostrou ao longo desse trabalho.

À professora Doutora Maria dos Anjos Pires agradeço como directora do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, pela amável disponibilidade com que sempre me recebeu.

Agradeço à Senhora Dona Lígia Lourenço pelo apoio técnico e a simpatia com que sempre me tratou.

Às Senhoras Dona Ana e Dona Glória gostaria de agradecer a ajuda sempre que solicitada.

Agradeço ao Doutor Abel Fernandes, pela gentileza de ceder as fotos do melanoma oral.

As minhas colegas de estágio a Andrea Ferreira, Helena Rodrigues e a Joana Gomes, um muito obrigado pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, José Carlos e Maria do Carmo, por todos os sacrifícios que fizeram para meu benefício, por todo o apoio e amor, sem eles nada disso seria possível.

Aos meus irmãos pelo apoio e amizade que sempre demonstraram, mesmo estando longe.

À toda minha família, por todo apoio, carinho e paciência, que sempre manifestaram, nos bons e maus momentos da minha vida.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos pelo apoio, motivação que me deram durante todo o tempo e sempre que preciso.

Na generalidade, agradeço a todos os professores que tudo me ensinaram com paciência e exigência e que contribuíram para a minha formação pessoal e académica.

Por fim agradeço a todos os que tornaram, directa e indirectamente, possível a execução deste trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores melanocíticos

O cancro é uma das causas mais comuns associada à morte de canídeos (Bronden *et al.*, 2009). O facto do homem e o cão compartilharem um ambiente comum faz com que esta espécie seja proposta como um bom modelo para o estudo do cancro no homem (Bronden *et al.*, 2009).

Os tumores melanocíticos são conhecidos desde a antiguidade, sendo chamado por Celsius de "melas", devido à sua cor negra. Em 1806, Laennec introduziu o termo "melanose" para descrever a doença pigmentada de pele, Em 1837, Carswell propôs o termo melanoma para tumores melanocíticos malignos (Baba *et al.*, 2007).

Os tumores melanocíticos são formados a partir de melanoblastos e melanócitos. Os melanócitos são células dendríticas derivadas dos melanoblastos neuroectodermais e da crista neural que migram durante a embriogénese para a epiderme, derme, membranas mucosas e olhos (Garma-Aviña *et al.*, 1981; Cangul, 2001; Goldschmidt & Hendrick, 2002; Smith *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2010). Morfologicamente são compostos por um citoplasma pálido e abundante, com quantidades variáveis de pigmento, núcleos grandes pleomórficos e nucléolos proeminentes sendo a sua principal função a síntese de melanina, pigmento que confere cor aos pelos, pele e cabelos e protege a pele contra os raios solares (Teixeira *et al.*, 2010).

Em todos os vertebrados, a pele é originada a partir de um tegumento embrionário primário, composto inicialmente por células da epiderme primitiva. Posteriormente ocorre a condensação de células mesenquimais, localizadas abaixo da epiderme e a pele primitiva passa a ser composta por duas camadas, a epiderme primitiva que dá origem a epiderme e a camada mesenquimal que dá origem à derme (Perrone, 2001). Na epiderme é possível destacar 4 tipos de células: queratinócitos (85% das células observadas na pele); células de Langerhans (3 a 8%), células de Merckel (2%) e os melanócitos (5%) (Muller *et al.*, 2001).

Embora a maioria dos melanomas ocorra na pele, eles podem desenvolver-se em qualquer outro local onde haja presença de melanócitos. A maior parte da melanina é encontrada na camada basal da epiderme, porém em cães de pele escura, este pigmento pode ser encontrado em todas as camadas da epiderme (Muller *et al.*, 2001). Deve-se ressaltar que, embora na vida embrionária a melanina seja produzida pela maior parte dos melanócitos, após

o nascimento a sua produção torna-se restrita aos melanócitos da epiderme e aos folículos pilosos (Haass *et al.*, 2005).

A etiologia deste tipo de neoplasia é desconhecida, contudo existem alguns factores genéticos e moleculares que poderão estar implicados no seu desenvolvimento (Withrow & Vail, 2007) como consanguinidade, trauma, exposição a produtos químicos, hormonas e susceptibilidade genética (Teixeira *et al.*, 2010).

Os melanócitos não possuem junções intercelulares entre si, mas possuem junções com os queratinócitos, através de moléculas de adesão, como a Caderina-E. Estas são células estáveis, que só proliferam em casos de qualquer alteração conducente à quebra das junções entre os melanócitos e os queratinócitos podendo levar à iniciação do processo tumoral, resultando num crescimento descontrolado e desenvolvimento de uma neoplasia (Withrow & Vail, 2007). Sendo assim, o controlo da sua regulação e proliferação é realizado pelos queratinócitos, através de vias parácrinas, comunicações intracelulares (via segundo mensageiro) e intercelulares (via moléculas de adesão e conexinas). Sob condições normais de homeostase os melanócitos permanecem quiescentes, proliferam, diferenciam-se ou sofrem apoptose (Haass *et al.*, 2005).

1.2. Tumores melanocíticos em canídeos

Nas últimas décadas, o aumento da incidência dos casos de melanomas em cães tem motivado cada vez mais o estudo do seu perfil e prognóstico, onde muitas variáveis dentro do tumor parecem influenciar a sobrevivência do animal, sendo que o primeiro relato de melanoma em cães foi descrito por Burkner no ano de 1882 (Ferreira *et al.*, 1997).

Os tumores melanocíticos, em cães, apresentam uma biologia extremamente diversificada e o comportamento desse tumor dependerá de vários factores. Assim, só uma maior compreensão destes factores ajudará o médico veterinário a delinear antecipadamente o prognóstico e o tratamento adequado. O comportamento biológico é influenciado não só pelas características morfológicas do tumor, como o tamanho e crescimento, pelas características histológicas do mesmo, mas também pela sua localização anatómica (Bergman *et al.*, 2007).

Apesar de existirem raças predispostas e localizações anatómicas mais frequentes, o caminho pela qual ocorre a conversão dos melanócitos normais em neoplásicos é um processo complexo, de pouco consenso, que se inicia com a mutação génica, ocasionando uma quebra da homeostase entre o queratinócito-melanócito, seguido pela promoção, transformação

celular e metástase. Em humanos 65% dos melanomas estão directamente relacionados com mutações genéticas, associada com a exposição crónica à radiação solar dos raios UVA e UVB (Smith *et al.*, 2002). A associação entre a exposição a raios ultravioletas e o desenvolvimento de melanomas que existe em seres humanos não tem sido demonstrada em animais domésticos, (Baba *et al.*, 2007) de qualquer forma, uma vez que os melanócitos adquirem sua autonomia, ou seja, conseguem escapar do controlo dos queratinócitos, passam a multiplicar-se de forma difusa, descontrolada e equivocada, levando à formação de tumores sólidos, que neste caso, podem assumir dois tipos de comportamento: benigno ou maligno, sendo que em ambos os casos a patogenia parece ser a mesma. Nos canídeos, os tumores melanocíticos classificam-se em benignos- os melanocitomas e malignos- os melanomas, de acordo com a classificação da OMS (1998) para medicina veterinária (Goldschmidt *et al.*, 1998).

Os locais mais comuns para o aparecimento da doença são a cavidade oral (56%), o lábio (23%), a pele (11%) e os dígitos (8%) (Smith *et al.*, 2002).

1.2.1. Tumores melanocíticos orais

Os melanomas orais são neoplasias relativamente comuns, que representam cerca de 1% de casos recebidos nos laboratórios de Anatomia Patológica Veterinária (Sánchez *et al.*, 2007).

Os melanomas orais são considerados extremamente agressivos, com grande capacidade de invasão local e metastização. Localizam-se na gengiva, lábios, língua e palato duro (Figura 1) (Bergman *et al.*, 2007e Ramos-Vara *et al.*, 2000).

São mais comuns nos cães com mucosa oral pigmentada (Figura 2) e nas raças Scottish Terrier, Golden Retriever, Poodle, Cocker Spaniel e Dachshund. Afectam mais frequentemente cães idosos, ou seja animais com idade superior a 10 anos, sem preferência por género (Bergman *et al.*, 2007; MacEwen *et al.*, 1999; Ramos-Vara *et al.*, 2000).

São geralmente formações nodulares únicas, de limites indefinidos, não capsuladas, de coloração cinzenta, castanha ou negra, dependendo do grau de pigmentação e de tamanho variável (Gross *et al.*, 2005).



Figura 1: Tumefação que corresponde a aumento do linfonodo regional que se encontra metastizado (Gentilmente cedido pelo Dr. Abel Fernandes)

Figura 2: Melanoma oral canino (Gentilmente cedido pelo Dr. Abel Fernandes)

As metástases são frequentes (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Independentemente da sua localização, os melanomas podem metastizar por via linfática ou sanguínea, sendo que os linfonodos regionais são normalmente os primeiros a serem afectados (Smith *et al.*, 2002). Os melanomas têm o potencial de invadir o tecido ósseo e causar a sua lise em áreas como o dígito, a maxila, a mandíbula, as vértebras e as costelas (Smith *et al.*, 2002). Não é incomum a metastização dos melanomas em outras localizações, incluindo o cérebro, coração e baço (Smith *et al.*, 2002).

Para a previsão do comportamento biológico de uma neoplasia melanocítica é essencial a determinação exacta do local de origem da mesma. A distância da metástase é indicador de um mau prognóstico para todas as neoplasias melanocíticas independentemente da sua localização (Smedley *et al.*, 2011). O local do tumor, o tamanho do tumor primário ou a profundidade de invasão, e o número de mitoses por campo de grande ampliação, ou por milímetro são utilizados histologicamente para prever o comportamento biológico (Garbe *et al.*, 2010). Apesar de na cavidade oral todas as lesões melanocíticas deverem ser encaradas como muito agressivas, um estudo realizado por Esplin (2008) mostrou que as neoplasias melanocíticas bem diferenciadas histologicamente apresentam um bom prognóstico, com tempo de sobrevida prolongado após remoção cirúrgica (Bergin *et al.*, 2011). Existe uma necessidade, portanto, para definir recursos adicionais que permita prever com precisão o

comportamento biológico de doenças melanocíticas e delinear o tratamento mais eficaz (Cuitino *et al.*, 2012).

1.2.2. Tumores melanocíticos cutâneos

O melanoma é uma das neoplasias cutâneas mais letais e a sua incidência está a aumentar em todo o mundo. Constituem cerca de 4 a 7% dos tumores cutâneos que atingem os cães (Smith *et al.*, 2002, Withrow & Vail, 2007), com a excepção dos tumores do leito ungueal (dígito) e junções mucocutâneas que seguem um percurso benigno na maioria das vezes (Millanta *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 1983; Withrow & Vail, 2007).

O melanoma cutâneo ocorre com maior frequência em cães com pele muito pigmentada. São por norma, bem definidos, têm geralmente menos de 2 cm de diâmetro, consistência firme e sem adesão aos tecidos subjacentes (Withrow & Vail, 2007), (Figura 3), a ulceração está ausente na maioria das lesões (Gross *et al.*, 2005). Geralmente manifestam-se como nódulos solitários, negros, castanhos ou acinzentados (Ginn, *et al.*, 2007).



Figura 3: Melanoma cutâneo canino

A etiologia exacta do melanoma cutâneo é desconhecida, porém a luz solar ionizante não parece ser um factor causal como é em seres humanos (Withrow & Vail, 2007). A localização é um indicador de prognóstico muito importante para o melanoma. As neoplasias cutâneas benignas aparecem sobretudo a nível da cabeça, tronco, escroto, axilas e membros posteriores (Garma-Avina *et al.*, 1981). Aproximadamente 80% dos tumores de pele são benignos e apenas 20% são malignos (Smedley *et al.*, 2011). Uma combinação de achados clínicos e as características morfológicas como a atipia nuclear e índice mitótico (IM) deve ser utilizado para prever o seu comportamento (Smedley *et al.*, 2011).

1.3. Diagnóstico

Antes da definição exacta de um prognóstico, um diagnóstico definitivo deve ser estabelecido (Smedley *et al.*, 2011). No caso dos melanomas, o diagnóstico é geralmente feito por avaliação histológica. A histopatologia permite obter o diagnóstico definitivo, além de permitir identificar a neoplasia em questão, permite também determinar o índice mitótico, que é altamente preditivo do grau de malignidade (aproximadamente 90% de precisão) (Withrow & Vail, 2007).

O diagnóstico de melanomas orais é considerado um desafio para o patologista, porque estes apresentam uma grande variação no grau de pigmentação, por vezes podem ser completamente não pigmentados e também apresentar uma enorme variabilidade celular (Ramos-Vara *et al.*, 2000). Outro factor complicado no diagnóstico é o repertório considerável de aparências microscópicas pois os melanomas podem assemelhar-se a outros tumores de células redondas como carcinomas, sarcomas, linfomas, tumores osteogénicos (Ramos-Vara *et al.*, 2000) plasmocitomas, histiocitomas, leiomiomas, rabdomiossarcomas, adenoma mamário complexo e tumor venéreo transmissível (Cangul *et al.*, 2001).

Um outro desafio do patologista é a distinção entre um tumor benigno e maligno. À excepção da invasão ganglionar ou metastização à distância, não existe um critério único de diagnóstico que permite a diferenciação definitiva entre tumores benignos e malignos. Por isso, são avaliados vários parâmetros, incluindo: proliferação (isto é, o índice mitótico), a morfologia das células e pleomorfismo, tamanho dos nucléolos, grau de pigmentação, invasão epitelial, actividade juncional e presença de êmbolos tumorais vasculares (Smith *et al.*, 2002; Baba *et al.*, 2007). O índice mitótico e a marcação imunohistoquímica com Ki-67 parecem ser bastante fiáveis para distinguirem tumores malignos de benignos (Gross *et al.*, 2005; Baba *et al.*, 2007). Sendo assim a confirmação imunohistoquímica do diagnóstico de melanomas é frequentemente necessária para estabelecer um prognóstico e plano terapêutico (Ramos-Vara *et al.*, 2000 e Smedley *et al.*, 2011).

Para o diagnóstico de melanoma cutâneo, as tradicionais técnicas de histoquímica estão a ser substituídas pela imunohistoquímica, incorporando o uso de anticorpo monoclonais e policlonais. Outros métodos incluem a microscopia electrónica e, mais recentemente a hibridação “*in situ*” (Smith *et al.*, 2002).

A utilização de técnicas de diagnóstico mais avançadas, como a citometria de fluxo, não oferece real vantagem sobre a histologia na predição do comportamento tumoral. A actividade

do anticorpo monoclonal Ki-67 que identifica células em proliferação correlaciona-se muito bem com uma baixa taxa de sobrevivência, tal como presença de crescimento invasivo e da classificação com base em critérios citológicos (Smith *et al.*, 2002).

Marcadores sorológicos, incluindo citocinas, moléculas de adesão celular, e inibitório-actividade melanoma, estão sendo investigados como potenciais ferramentas no estudo do melanoma (Garbe *et al.*, 2010).

1.4. Tratamento

O tratamento para cães com melanoma muitas vezes começa com o controlo local do tumor, geralmente através da excisão cirúrgica. A excisão cirúrgica é muitas vezes curativa, mas o exame histopatológico é fundamental para a delimitação das margens bem como para a descrição das características citológicas (Bergman *et al.*, 2007). A radioterapia, a quimioterapia, e a vacina de melanoma também têm sido utilizados como terapia adjuvante.

A radioterapia está recomendada para situações em que a excisão do tumor foi incompleta ou quando existem metástases ganglionares (Bergman *et al.*, 2008).

A quimioterapia também tem sido utilizada no combate aos melanomas, no entanto tem demonstrado baixas taxas de resposta (Bergman *et al.*, 2008).

Outras modalidades reportados para controlo local do tumor incluíram implantes intralesionais de cisplatina, bleomicina intralesional com pulsação electrónica, e muitos outros. Também tem sido relatado o uso de um único agente, dacarbazina, melfalano, ou doxorubicina. A imunoterapia também representa uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento de melanoma (Bergman *et al.*, 2007).

1.5. A proliferação celular

O crescimento tumoral depende directamente dos genes responsáveis pela proliferação celular e apoptose. A análise de factores como a actividade proliferativa e apoptótica caracterizam o perfil biológico dos tumores podendo então influenciar no prognóstico dos pacientes (Scully *et al.*, 2000).

Com o propósito de tentar estabelecer um prognóstico fiável, têm sido realizados diversos estudos que investigam novos factores de prognóstico e que incluem as características histológicas do tumor (Roels *et al.*, 1999). No entanto, devido à grande variabilidade

histológica destes tumores, a relação destas características com o comportamento biológico das lesões melanocíticas é ainda pouco consensual (Hrabeta *et al.*, 2007; Spangler & Kass, 2006). O índice mitótico é tido, para alguns autores (Ginn, *et al.*, 2007; Withrow & Vail, 2007), como sendo o critério histológico com maior valor prognóstico, como comprovam os estudos realizados por Wilcock & Peiffer Jr (1986) no melanoma ocular canino. Em medicina humana, por outro lado, a profundidade do tumor é tida como o factor prognóstico mais significativo, surgindo recentemente estudos que evidenciam igualmente a importância da ulceração cutânea (Sarpa *et al.*, 2006). Para além dos critérios morfológicos clássicos, outros factores de prognóstico têm sido estudados como por exemplo a proliferação celular.

A actividade proliferativa tem fornecido informações valiosas relativas à cinética do crescimento celular, à progressão do tumor e prognóstico (Rieger *et al.*, 1993). A identificação de antigénios associados com o ciclo celular e o subsequente desenvolvimento de anticorpos monoclonais tem oferecido um método simples para a estimativa da actividade proliferativa (Millanta *et al.*, 2002). Uma vez que a proliferação celular descontrolada representa uma característica comum de células malignas, a imunohistoquímica marcando a expressão da proteína Ki-67 tem sido uma importante ferramenta no prognóstico e tratamento de cancro (Kausch *et al.*, 2003).

Em 1983, na universidade de Kiel na Alemanha, Gerdes *et al.* (1992) produziram o Ki-67, obtido através da 67ª placa de cultura em tecido, e sendo definido como anticorpo monoclonal de murganho. Trata-se de uma IgG1 (imunoglobulina G1) de murganho produzida contra uma fracção nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin. A estrutura química do antigénio reconhecido pelo reagente com o Ki-67 é desconhecido. A massa molecular é de 345 a 395 kDa e o cromossoma 10 parece estar envolvido na expressão da proteína que apresenta íntima associação com o ciclo celular (Key *et al.*, 1993). O Ki-67 (sendo o MIB-1 o anticorpo monoclonal, que é reactivo contra o antigénio nuclear Ki-67) está presente em todas as fases activas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas ausente em fase de repouso (G0) (Garbe *et al.*, 2010). A imunomarcagem MIB-1 tem-se revelado extremamente importante e eficaz na classificação de tumores e correlação com a sobrevivência dos pacientes em uma variedade de tumores humanos (Brown & Gatter 1990; Millanta *et al.*, 2002). Tem sido também relatada a sua correlação com os parâmetros histológicos relacionados com prognóstico (Soyer, 1991; Rieger *et al.*, 1993; Millanta *et al.*, 2002).

No melanoma cutâneo do cão, a fracção proliferativa determinada pelo Ki-67 tem maior valor prognóstico do que a histologia clássica (91%). Isto sugere fortemente que a utilização

de Ki-67 no melanoma cutâneo deve ser normalmente realizada após o diagnóstico histopatológico (Bergman *et al.*, 2007). Por outro lado, a determinação da fracção de crescimento pelo Ki-67 poderá também ser útil na distinção entre tumores benignos e malignos (Ohsie *et al.*, 2008).

No melanoma oral do cão, uma fracção proliferativa determinada pelo Ki-67, superior a 15%, parece estar associada a taxas de sobrevida inferiores a 1 ano (Bergin *et al.*, 2011). No entanto, os estudos são ainda escassos e não consensuais.

2. OBJECTIVOS:

Neste estudo pretendeu-se estudar a fracção de células em proliferação em tumores melanocíticos dos canídeos através de:

- Contagem do número de mitoses
- Contagem de células positiva ao Ki-67

Pretendeu-se ainda relacionar o número de mitose com a fracção proliferativa obtida pelo Ki-67.

É ainda objectivo deste estudo relacionar os dados da proliferação celular com características histopatológicas classicamente associadas à agressividade dos tumores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Na elaboração deste trabalho, foram analisados os tumores melanocíticos caninos, recebidos no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (LHAP-UTAD).

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação clínica

Em todos os casos possíveis, foram recolhidas informações referentes à identificação do animal (idade, género, raça), à localização e ao tamanho da lesão.

3.2.2. Estudo histopatológico

O material foi recolhido e fixado em formol a 10%, incluído em parafina sintética Histoplast®- Shandon®, seguindo a metodologia habitual. Após inclusão, foram realizados cortes de cada um dos tumores com 3 µm de espessura num micrótomo automático Leica® RM 2255. Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas e foram levados à estufa a 37°C para secarem. Após secagem, foram desparafinados em xilol, hidratados numa série de álcoois decrescentes, procedendo-se à coloração convencional com hematoxilina-eosina (HE) para posterior diagnóstico histopatológico.

A presença de melanina nas lesões melanocíticas caninas dificulta o seu diagnóstico histológico, já que dificulta a observação das características citoplasmáticas e nucleares das células tumorais. Assim, para uma correcta observação e classificação das lesões, foi efectuado o branqueamento das amostras, segundo o método proposto por Pearse (1972), citado por Carleton *et al.* (1980). Este método consistiu na desparafinação da amostra, na sua hidratação, colocação em permanganato de potássio (KMnO₄) a 0,1% durante a noite, passagem por água, colocação em ácido oxálico (H₂C₂O₄) a 1% durante 1min., lavagem e posterior coloração com HE.

Todos os casos foram observados com a coloração de HE com e sem branqueamento. O diagnóstico histopatológico foi realizado em conformidade com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Goldschmidt *et al.*, 1998), por dois observadores independentes e segundo os mesmos critérios, num microscópio Olympus® BH-2.

Os critérios histológicos avaliados foram:

- Tipo celular: fusiformes, epitelióides (redondas) e mistas, de acordo com as células predominantes no tumor, segundo Smith *et al.* (2002);
- Tamanho do tumor: expresso em centímetros;
- Actividade juncional: presente (P) ou ausente (A), segundo Spangler & Kass (2006);
- Grau de atipia nuclear: escasso (1), moderado (2), acentuado (3), segundo Millanta *et al.* (2002);
- Infiltração linfoplasmocitária: presente (P) ou ausente (A).
- Necrose intratumoral: presente (P) ou ausente (A), segundo Spangler & Kass (2006);
- Células gigantes: presente (P) ou ausente (A), segundo Spangler & Kass (2006);
- Ulceração: presente (P) ou ausente (A);
- Grau de pigmentação celular: ausente (0), escasso (1), moderado (2), acentuado (3);
- Quantidade de estroma: escassa (1), moderada (2), acentuada (3), segundo Ramos-Vara *et al.* (2000);
- Células tumorais intravasculares (CTI): presente (P) ou ausente (A), segundo Ramos-Vara *et al.* (2000);

3.2.3. Determinação do índice mitótico

A contagem de mitoses foi efectuada na coloração de HE com branqueamento. O índice mitótico foi expresso pelo número de mitoses por campo de grande ampliação (objectiva 40x). Em média foram contados 10 campos, nas diferentes regiões do tumor.

3.2.4. Estudo imunohistoquímico

Para a análise imunohistoquímica foram efectuados cortes seriados de cada um dos tumores com 3 µm de espessura, sendo posteriormente colados em lâminas revestidas com

solução de Silane (3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma ®), de acordo com a metodologia convencional.

A expressão do Ki-67 foi obtida pelo método da estreptavidina biotina peroxidase, utilizando o Sistema de detecção Ultravision, da Labvision ®

Em cada procedimento foram utilizados 2 controlos: um positivo e um negativo. A pele normal (camada basal) e um linfonodo de cão foram utilizadas para servir de controlo positivo. No corte usado como controlo negativo, o anticorpo primário foi substituído por tampão fosfato salino (PBS, com pH=7,4). Adicionalmente, sempre que existia pele anexa ao tumor, esta constitui um controlo positivo interno.

Os cortes foram desparafinados em xilol durante 15 minutos e hidratados com uma série de álcoois de concentração decrescente (100%, 90%, 80% e 70%).

Todos os cortes foram submetidos a um pré-tratamento térmico em microondas (lâminas imersas em solução de tampão citrato com pH=6,2), 3 ciclos de 5 minutos a 750 W, para recuperação antigénica.

Após tratamento térmico foram deixados a arrefecer à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se ao branqueamento dos cortes numa solução de permanganato de potássio (KMnO₄) a 0,1%, durante 30-40 minutos seguida de imersão numa solução de ácido oxálico (H₂C₂O₄) a 0,1% durante 10 minutos (este tempo era variável de acordo com a pigmentação da amostra).

A inibição das peroxidases endógenas foi conseguida com peróxido de hidrogénio a 3%, durante 30 minutos, sendo o seu excesso removido com PBS, em duas lavagens sucessivas.

Os cortes foram então incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos com **Bloqueador Ultra V**. Em seguida, procedeu-se à incubação com o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (Clone MIB-1, Dako ®), na diluição de 1:50 em PBS com pH=7,4) por um período de 24 horas, a 4°C. Todas as incubações foram feitas em câmara húmida horizontal, Bio Optica ®.

Após o referido período de incubação, o anticorpo primário foi removido com quatro lavagens com tampão PBS e os cortes foram incubados 10 minutos com Soro Anti-**Polivalente de Cabra Biotinilado** (anticorpo secundário) à temperatura ambiente. Efectuaram-se duas novas lavagens com PBS e nova incubação de 10 minutos com soro **Streptavidina Peroxidase** à temperatura ambiente, à qual se seguiu uma lavagem.

A revelação das lâminas foi efectuada com uma incubação de 10 minutos em solução aquosa de tetra-hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) Novo Castra®, à qual se adicionou 2 µl de H₂O₂ (a 30%) por cada mililitro (ml) de solução.

Posteriormente, para a realização do contraste nuclear ou contra-coloração, as lâminas foram imersas numa solução de Hematoxilina de Gill, durante 1 minuto, seguindo-se uma lavagem em água corrente morna até as lâminas contrastarem de azul (aprox. 10 minutos). Finalmente, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas, utilizando a cola Entellan (Merck®).

3.2.5. Determinação da fracção do crescimento pelo Ki-67

Foi considerada imunorreactividade quando a marcação ocorria no núcleo, independentemente da intensidade de marcação. Efectuou-se a observação exaustiva de cada preparação na sua totalidade, seleccionando-se a área do tumor com positividade nuclear mais elevada e homogénea. A observação da área seleccionada foi realizada com a objectiva de 40x, tendo-se determinado, em termos percentuais, a fracção de núcleos positivos, num total de pelo menos 1000 células tumorais, contabilizadas em 8 a 10 campos. As contagens foram efectuadas sempre pelo mesmo observador, num microscópio Nikon FXA®, com ocular com quadrícula, tendo em conta a morfologia celular. As áreas superficiais e as áreas profundas foram evitadas devido à presença de infiltrado inflamatório.

3.2.6. Análise estatística

Para o Ki-67 foi efectuada a análise estatística descritiva com o cálculo da média, desvio padrão, máximo, mínimo e mediana.

Os testes estatísticos realizados foram os testes Qui-quadrado (χ^2), análise de variância (ANOVA), análise de Post-hoc (teste de Tukey) e a correlação de Pearson,

Todas as análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao sistema SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IL, EUA), versão 12.0. Os valores obtidos foram considerados significativos para um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação clínica

Neste estudo foram avaliados 48 tumores melanocíticos caninos, das quais 9 eram tumores benignos ou melanocitomas e 39 tumores malignos ou melanomas. Estes tumores foram recebidos no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (LHAP-UTAD). Os tumores constituíam massas, únicas, umas circunscritas outras de limites indistintos, com diferentes tamanhos, umas sem pigmentação evidente e outras com coloração negra.

➤ Localização

No que diz respeito à localização dos tumores, pode observar-se no quadro 1 que 29 casos tinham localização cutânea, sendo que desses 29 cutâneos, 9 foram classificados como melanocitomas e 20 como melanomas. Os restantes 19 estavam localizados na cavidade oral, sendo todos melanomas.

Quadro 1: Classificação histológica das amostras incluídas no estudo (n=48).

Localização	Classificação Histológica	Amostra (n=48)	
		n	%
Cutâneo	Melanocitomas	9	18,8
	Melanomas malignos	20	41,7
Oral	Melanocitomas	0	0,0
	Melanomas malignos	19	39,6

➤ Raça

Dentro das raças com maior casuística, como se pode observar na figura 4, destaca-se a raça Boxer (n=10), seguida de Cocker Spaniel (n= 5), Caniche (n=3), Rottweiler (n=3), sendo as restantes pertencentes as raças: Labrador Retriever. (n=2) Chow Chow (n=1), Doberman (n=1), Golden (n=1), Pequinois (n=1), e Rafeiro A. (n=1). Os animais sem Raça Definida representam 20 casos em toda amostra.

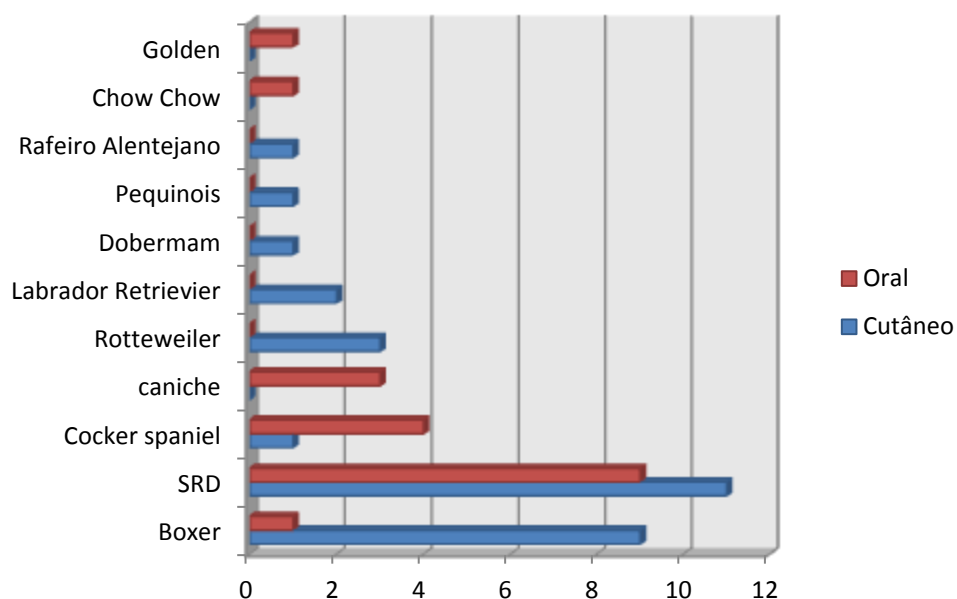


Figura 4: Distribuição racial pelos 2 grupos de lesões melanocíticas. (SRD- sem raça definida)

➤ Idade

Nas 48 amostras, só foi possível ter informação relativo á idade de 37 animais. O intervalo de idades das amostras variou entre 1 e 16 anos. A média de idades foi de $10,35 \pm 3,58$ anos.

➤ Tamanho

Relativamente à dimensão dos tumores, foram obtidos dados para o tamanho de apenas 32 amostras. Na figura 5 podemos observar que 17 tumores tinham dimensões maiores ou iguais a 2 centímetros e apenas 15 tumores apresentaram menor que 2 centímetros.

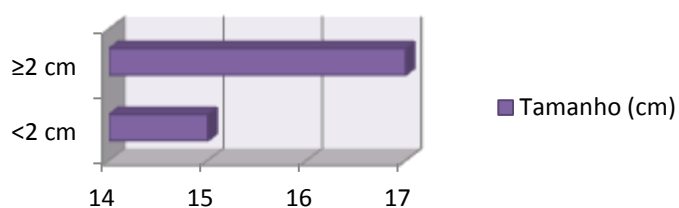


Figura 5: Distribuição dos melanomas caninos por tamanho da lesão

No quadro 2, são apresentadas, resumidamente, as frequências absolutas e relativas das diferentes variáveis clínicas em estudo.

Quadro 2: Variáveis clínicas e respectivas frequências absolutas e relativas.

Variáveis Clínicas	n	%
Localização (n=48)		
Oral	19	39,6
Cutâneo	29	60,4
Gênero (n=42)		
Macho	28	66,7
Fêmea	14	33,3
Tamanho (n=32)		
<2 cm	15	46,9
≥2 cm	17	53,1
Raça (n=28)		
Boxer	10	35,7
Cocker Spaniel	5	17,9
Caniche	3	10,7
Rottweiler	3	10,7
Labrador Retriever	2	7,1
Dobermam	1	3,6
Pequinois	1	3,6
Rafeiro Alentejano	1	3,6
Chow Chow	1	3,6
Golden Retriever	1	3,6

4.2. Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica dos 48 tumores melanocíticos caninos em estudo permitiu-nos verificar que nos melanomas orais, em cerca de metade dos casos predominavam as células epitelióide (n=10; 52,6% dos casos), seguido de misto com 36,8% dos casos. A actividade juncional assim como a proliferação intraepitelial estiveram ausentes em 84,2% dos casos, contrariamente à ulceração que esteve presente em 84,2% das amostras. A atipia nuclear apresentou grau 3 em 57,9% dos casos (Figura 6 e 7). A presença de necrose, Infiltrado linfoplasmocitário e células gigantes evidenciou-se na maioria das amostras tumorais observadas, enquanto as células tumorais intravasculares (CTI) apresentaram uma ausência de 62,3%. O estroma tumoral era na maioria dos casos escasso (n=11; 57,9%).

Nos 9 melanocitomas cutâneos avaliados, 78% (7 casos) apresentaram células do tipo epitelióide, sendo que as restantes 22% eram todas do tipo fusiforme. A maioria apresentou localização em epiderme e derme simultaneamente. Verificou-se uma ausência de necrose, células gigantes e ulceração em 100% dos casos. A actividade juncional assim como a proliferação intraepitelial estavam presentes em mais de metade das amostras observadas (78% e 89% respectivamente).

Quanto aos melanomas cutâneos a maioria das células eram do tipo epitelióide (n=8; 40% dos casos) e fusiforme (n=7; 35% dos casos), seguido de células mistas com 5 casos, representando 25% de células em cutâneos. Nenhum tumor se limitou à epiderme, sendo a sua localização predominantemente a nível da derme e epiderme simultaneamente (n=11; 55% casos). A actividade juncional estava presente em 50% dos casos, assim como a Infiltrado linfoplasmocitário que também marcou presença em pouco mais de metade dos casos (65% dos casos). Também a necrose marcou presença em 60% dos cutâneos. A atipia nuclear apresentou grau 3 em 50% dos casos, contrariamente ao estroma que, por sua vez, mostrou maior predisposição ao grau 2 em 45% dos casos. A ausência de células gigantes, proliferação intraepitelial e células tumorais intravasculares foi notória na maioria das amostras.

Todos os parâmetros histopatológicos de natureza categórica que foram alvo de avaliação estão descritos no Quadro 3.

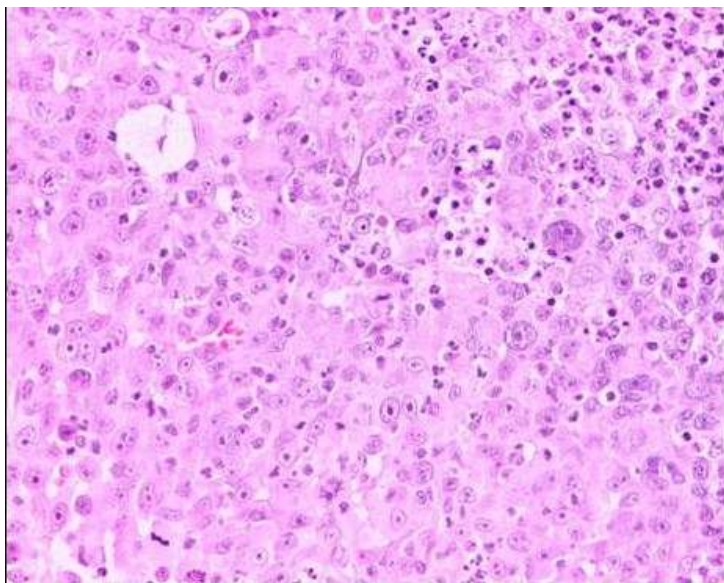


Figura 6: Melanoma oral com acentuada atipia citonuclear, HE (400x)

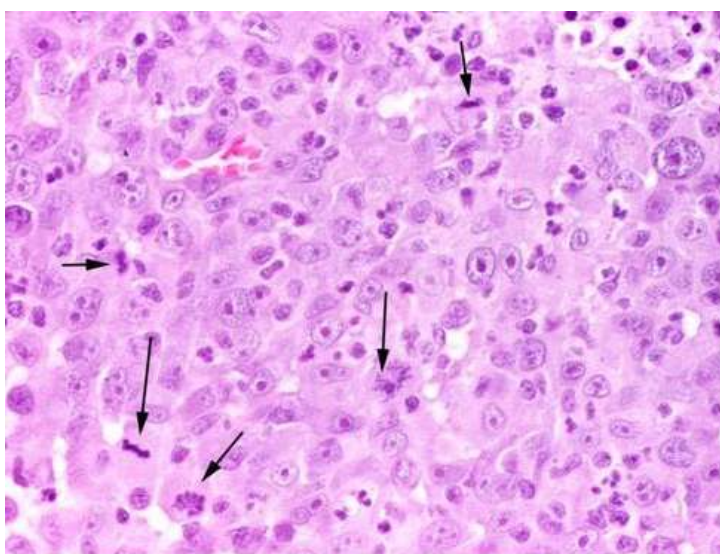


Figura 7: Melanoma oral com atipia acentuada, observando-se várias mitoses, algumas das quais atípicas. HE (600x)

Quadro 3: Caracterização histopatológica das amostras em estudo.

Características Histopatológicas		Melanomas Oraís (n=19)		Melanocitomas (n=9)		Melanoma Cutâneo (n=20)	
		n	%	n	%	n	%
Tipo de células	Fusiforme	2	10,5	2	22,2	7	35
	Misto	7	36,8	0	0,0	5	25
	Epitelióide	10	52,6	7	77,8	8	40
Localização	Epiderme/ epitélio	0	0,0	2	22,2	0	0
	Derme/ submucosa	0	0,0	1	11,1	9	45
	Ambas	0	0,0	6	66,7	11	55
Actividade Juncional	Presente	3	15,8	7	77,8	10	50
	Ausente	16	84,2	2	22,2	10	50
Atíпия Nuclear	1	4	21,1	8	88,9	4	20
	2	4	21,1	1	11,1	6	30
	3	11	57,9	0	0,0	10	50
Infiltrado linfoplasmocitário	Presente	18	94,7	1	11,1	13	65
	Ausente	1	5,3	8	88,9	7	35
Necrose	Presente	14	73,7	0	0,0	12	60
	Ausente	5	26,3	9	100,0	8	40
Células gigantes	Presente	11	57,9	0	0,0	8	40
	Ausente	8	42,1	9	100,0	12	60
Proliferação intraepitelial	Presente	3	15,8	8	88,9	9	45
	Ausente	16	84,2	1	11,1	11	55
Ulceração	Presente	16	84,2	0	0,0	12	60
	Ausente	3	15,8	9	100,0	8	40
Estroma	1	11	57,9	1	11,1	6	30
	2	5	26,3	5	55,6	9	45
	3	3	15,8	3	33,3	5	25
Células tumorais intravasculares	Presente	7	36,8	0	0,0	7	35
	Ausente	12	63,2	9	100,0	13	65

4.3. Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos

4.3.1. Índice mitótico

A contagem do índice mitótico das nossas amostras (n=48) variou de 1 a 74/10 HPF (High Power Fields), com a mediana de 10 HPF, apresentando um valor médio de $16,35 \pm 16,1$ (Quadro 4).

4.3.2. Índice Ki-67

Nos tumores melanocíticos caninos incluídos neste estudo, como mostra o quadro 4, a actividade proliferativa marcada pelo Ki-67 teve um valor mínimo de 1% e o máximo de 82%, com uma mediana de 27% sendo a média de $29,65 \pm 21,12$ %.

Quadro 4: índice de proliferação das amostras em estudo.

	N	Minino	Máximo	Mediana	Media	Std.
Ki-67%	48	1	82	27	29,65	21,12
IM	48	1	74	10	16,35	16,10

n – numero de amostra; std– desvio padrão

4.4. Associação entre proliferação celular e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos

4.4.1. Associação entre a proliferação celular determinada pelo IM e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos

No que diz respeito ao índice mitótico, este mostrou que os tumores malignos localizados na pele tinham maior índice ($15,0 \pm 12,7$) quando comparados com os benignos ($3,3 \pm 3,1$) também localizados na pele (Quadro 5). Nos tumores melanocíticos localizados na pele o IM foi ainda menor do que nos melanomas orais ($24,0 \pm 18,8$), essa associação do IM com a classificação e localização mostrou ser estatisticamente significativo ($p=0,004$; $p=0,006$

respectivamente). Outras características tiveram também associação significativa com o índice mitótico como a Infiltrado linfoplasmocitário ($p=0,012$), a necrose ($p=0,028$), a presença de células gigantes ($p=0,007$) e a ulceração ($p=0,002$). Ao contrário destes, o tipo celular a actividade juncional e a proliferação intraepitelial não revelaram níveis de significância para o IM. A atipia nuclear ($p=0,009$), também mostrou significância com o IM, sendo que de acordo com a análise de Post-hoc (teste de tukey) as características com diferentes letras na linha superior tem significado estatístico entre si.

Quadro 5: Associação entre o IM e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos

Características histopatológicas		n	IM		p
			Media%	± std	
Classificação	Melanocitoma	9	3,3	3,1	0,004
	Melanoma cutâneo	20	15,0	12,7	
	Melanoma oral	19	24,0	18,8	
Localização	Cutânea	29	11,3	11,9	0,006
	Oral	19	24,0	18,8	
Tipos de células	Epitelióide	25	16,9	19,2	0,909
	Misto	12	17,0	11,3	
	Fusiforme	11	14,5	13,8	
Actividade juncional	Ausente	28	19,3	17,6	0,137
	Presente	20	12,3	13,1	
Atipia nuclear	1	16	8,9	10,3 ^a	0,009
	2	11	12,6	12,3 ^{ab}	
	3	21	24,1	18,4 ^b	
Infiltrado linfoplasmocitário	Ausente	16	8,3	10,8	0,012
	Presente	32	20,4	16,9	
Necrose	Ausente	22	10,9	13,0	0,028
	Presente	26	21,0	17,2	
Células gigantes	Ausente	29	11,4	11,7	0,007
	Presente	19	24,0	19,0	
Proliferação intraepitelial	Ausente	28	18,2	14,8	0,359
	Presente	20	13,8	17,8	
Ulceração	Ausente	20	8,2	10,4	0,002
	Presente	28	22,2	17,0	
Estroma	1	18	20,2	19,6	0,235
	2	19	16,6	13,6	
	3	11	9,6	12,7	
Células tumorais intravasculares	Ausente	34	14,2	16,3	0,141
	Presente	14	21,7	14,9	

n– numero de amostra; std– desvio; padrão; p – significância estatística

4.4.2. Associação entre a proliferação celular determinada pelo Ki-67 e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos

Relativamente à actividade proliferativa nos tumores melanocíticos, podemos verificar que o Ki-67 apresenta uma relação significativa com a classificação tumoral ($p=0,001$) (Quadro 6). Nos tumores benignos (melanocitomas), observamos que a média da proliferação marcada pelo Ki-67 é bastante inferior aos tumores considerados malignos independentemente das suas localizações (ver Figuras 8 a 10), que por sua vez também apresentou uma relação bastante significativa com o Ki-67 ($p=0,001$). De acordo com o teste de tukey a classificação tumoral mostrou diferença significativa entre todas as categorias. Os tumores localizados na cavidade oral mostraram ter em média níveis superiores de Ki-67 $41,8 \pm 20\%$. Quanto à atipia nuclear, o grau 3 foi o que mostrou maior taxa de proliferação celular, sendo o nível de significância de $p=0,002$, de acordo com o teste de tukey o grau 3 mostrou diferenças significativas relativamente as restantes. A Infiltrado linfoplasmocitário ($p=0,001$), necrose ($p=0,006$), ulceração ($p=0,006$) e células tumorais intravasculares ($p=0,014$) também mostraram relação significativas com o Ki-67. Apesar da maioria das células apresentarem o estroma 2, a média da marcação imunohistoquímica foi superior nos tumores de grau 1 ($35,6 \pm 19,5\%$), mas no entanto houve uma associação estatisticamente significativa entre o Ki-67 e a quantidade de estroma ($p=0,039$), sendo que categorias com diferentes letras na linha superior tem significado estatístico entre si. Em contrapartida o tipo celular, a actividade juncional e a proliferação intraepitelial não revelaram qualquer associação significativa com o Ki-67.

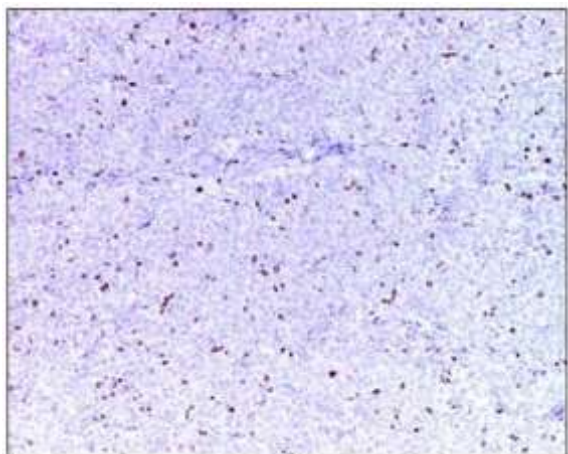


Figura 8: Expressão de Ki-67 melanoma cutâneo (200x)

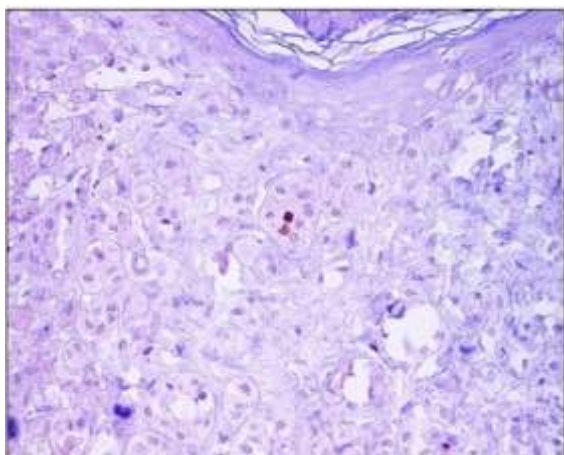


Figura 9: Expressão de Ki-67 em melanocitoma cutâneo (400x).

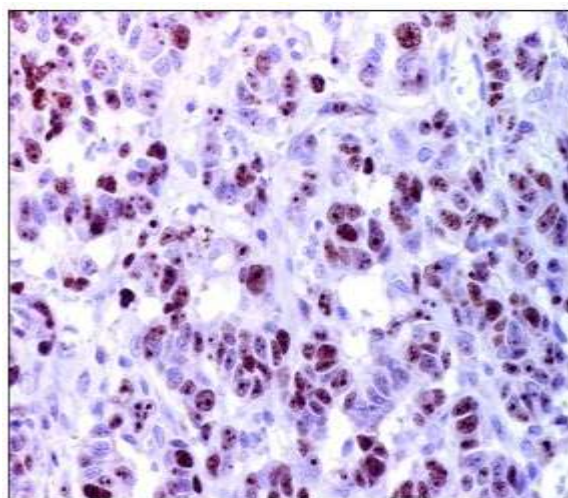


Figura 10: Expressão de Ki-67 em melanoma oral (600x)

Quadro 6: Associação entre o Ki-67 e as características histopatológicas nos tumores melanocíticos caninos

Características histopatológicas		n	Ki-67		P
			Media% ± sd		
Classificação	Melanocitoma	9	12,7	14,9	0,001
	Melanoma cutâneo	20	25,8	18,1	
	Melanoma oral	19	41,8	20,0	
Localização	Cutânea	29	21,7	18,0	0,001
	Oral	19	41,8	20,0	
Tipos de células	Epitelióide	25	30,0	22,1	0,3
	Misto	12	35,8	21,5	
	Fusiforme	11	22,1	17,5	
Actividade juncional	Ausente	28	32,9	21,7	0,211
	Presente	20	25,1	20,0	
Atipia nuclear	1	16	18,9	19,0	0,002
	2	11	23,0	17,8	
	3	21	41,3	19,0	
Infiltrado linfoplasmocitário	Ausente	16	15,6	15,6	0,001
	Presente	32	36,7	20,1	
Necrose	Ausente	22	20,7	18,5	0,006
	Presente	26	37,2	20,5	
Células gigantes	Ausente	29	22,1	18,2	0,001
	Presente	19	41,2	20,4	
Proliferação intraepitelial	Ausente	28	33,9	20,2	0,103
	Presente	20	23,8	21,5	
Ulceração	Ausente	20	20,0	18,2	0,006
	Presente	28	36,5	20,6	
Estroma	1	18	35,6	19,5 ^a	0,039
	2	19	32,0	21,8 ^{ab}	
	3	11	15,9	17,8 ^b	
Células tumorais intravasculares	Ausente	34	24,9	19,0	0,014
	Presente	14	41,1	22,4	

n– numero de amostra; std– desvio; padrão; *p* – significância estatística

4.4.3. Relação entre o índice mitótico e o índice de proliferação do Ki-67 nos tumores melanocíticos caninos

De forma a concluir acerca da possível relação entre os valores médios do índice mitótico e o índice de proliferação do Ki-67, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Pela análise do quadro 7, podemos verificar que existiu uma correlação positiva ($r=0,45$; $p=0,001$) entre os valores médios do Ki-67 e o IM.

Quadro 7: Relação entre os valores médios do Ki-67 e do IM- correlação de Pearson

		IM
Ki-67	n	48
	r	0,45
	P	0,001

n – número de amostras; r – coeficiente de correlação; p – significância estatística

4.5. Associação entre proliferação celular e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos

4.5.1. Associação entre a proliferação celular determinada pelo IM e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos

Para melhor compreender a actividade proliferativa nos tumores melanocíticos do cão e o seu impacto na agressividade e metastização dos mesmos, a análise estatística foi efectuada separadamente no grupo dos tumores malignos.

Os tumores localizados na cavidade oral apresentaram um maior número de mitoses do que os localizados na pele. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,085$). Também para a presença de células gigantes, ulceração, êmbolos se observou situação semelhante. Apesar da proliferação ser maior nos tumores com células gigantes, ulcerados e com células tumorais intravasculares, as associações não foram estatisticamente significativas. Não se observaram outras associações com nenhuma das variáveis histopatológicas (Quadro 8).

Quadro 8: Associação entre o IM e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos

Características histopatológicas		N	IM		P
			Media% ± std		
Localização	Cutânea	20	15,0	12,7	0,085
	Oral	19	24,0	18,8	
Tipos de células	Epitelióide	18	22,4	20,0	0,576
	Misto	12	17,0	11,3	
	Fusiforme	9	16,4	14,5	
Actividade juncional	Ausente	26	20,5	17,6	0,533
	Presente	13	17,0	14,0	
Atipia nuclear	1	8	14,5	12,0	0,155
	2	10	13,4	12,6	
	3	21	24,1	18,4	
Infiltrado linfoplasmocitário	Ausente	8	13,0	13,7	0,224
	Presente	31	21,0	16,8	
Necrose	Ausente	13	16,1	14,7	0,384
	Presente	26	21,0	17,2	
Células gigantes	Ausente	20	15,0	12,4	0,089
	Presente	19	24,0	19,0	
Proliferação intraepitelial	Ausente	27	18,7	14,8	0,714
	Presente	12	20,8	20,2	
Ulceração	Ausente	11	12,2	12,7	0,087
	Presente	28	22,2	17,0	
Estroma	1	17	21,2	19,6	0,439
	2	14	20,9	13,2	
	3	8	12,6	13,8	
Células tumorais intravasculares	Ausente	25	18,0	17,4	0,51
	Presente	14	21,7	14,9	

n– numero de amostra; std– desvio; padrao; *p* – significância estatística

4.5.2. Associação entre a proliferação celular determinada pelo Ki-67 e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos

Na análise estatística nos melanomas observou-se que o índice de proliferação determinado pelas células positivas para Ki-67 se associou de forma significativa com a localização tumoral como se pode confirmar no Quadro 9. A média de marcação do Ki-67 nos

melanomas orais é maior que nos cutâneos, revelando um significância de $p=0,013$. O Ki-67 associou-se estatisticamente com a atipia nuclear ($p=0,029$), sendo que de acordo com o teste de tukey as categorias com diferentes letras na linha superior tem significado estatístico entre si. A Infiltrado linfoplasmocitário ($p=0,009$) e a presença de células gigantes ($p=0,022$) também mostraram significância para o Ki-67.

Quadro 9: Associação entre Ki-67 e as características histopatológicas nos melanomas malignos caninos

Características histopatológicas		n	Ki-67		P
			Media% ±	std	
Localização	Cutânea	20	25,8	18,1	0,013
	Oral	19	41,8	20,0	
Tipos de células	Epitelióide	18	37,5	20,5	0,19
	Misto	12	35,8	21,5	
	Fusiforme	9	22,7	17,2	
Actividade juncional	Ausente	26	34,2	21,5	0,803
	Presente	13	32,4	19,1	
Atipia nuclear	1	8	27,6	20,3 ^a	0,029
	2	10	22,1	18,4 ^{ab}	
	3	21	41,3	19,0 ^b	
Infiltrado linfoplasmocitário	Ausente	8	17,0	16,8	0,009
	Presente	31	37,8	19,4	
Necrose	Ausente	13	26,2	19,3	0,116
	Presente	26	37,2	20,5	
Células gigantes	Ausente	20	26,4	18,3	0,022
	Presente	19	41,2	20,4	
Proliferação intraepitelial	Ausente	27	33,9	20,6	0,871
	Presente	12	32,8	21,2	
Ulceração	Ausente	11	26,0	19,0	0,151
	Presente	28	36,5	20,6	
Estroma	1	17	37,6	18,0	0,132
	2	14	36,1	22,6	
	3	8	20,6	18,8	
Células tumorais intravasculares	Ausente	25	29,4	18,5	0,087
	Presente	14	41,1	22,4	

n– numero de amostra; std– desvio; padrao; p – significância estatística

4.5.3. Relação entre o índice mitótico e o índice de proliferação do Ki-67 nos melanomas malignos caninos

De forma a inferir acerca da possível relação entre os valores médios do índice mitótico e o índice de proliferação determinado pelo Ki-67, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Pela análise do quadro 10, podemos verificar que existiu uma correlação positiva ($r=0,356$; $p=0,026$) entre os valores médios do Ki-67 e o IM.

Quadro 10: Relação entre os valores médios do Ki-67 e do IM- correlação de Pearson

		IM
Ki-67	n	39
	r	0,356
	P	0,026

n – número de amostras; r – coeficiente de correlação; p – significância estatística

5. DISCUSSÃO

A utilização de técnicas moleculares tem proporcionado aos oncologistas uma melhor compreensão dos eventos envolvidos no processo de carcinogénese, resultando em novas informações que influenciam a conduta e a tomada de decisões terapêuticas (Wakamatsu *et al.*, 1995; Philips *et al.*, 1999; Moura *et al.*, 2006).

Além das evidências clínicas e características histopatológicas, os aspectos relacionados com a biologia dos tumores são considerados no sentido de se prever o comportamento das lesões, independentes de qualquer tipo de procedimento adjuvante, bem como da sua resposta a um determinado tipo de terapia, constituindo os chamados factores prognósticos (Wakamatsu *et al.*, 1995; Akrish *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2006).

As neoplasias melanocíticas são caracterizadas pela proliferação contínua benigna ou maligna de células produtoras de melaninas (melanócitos). Diversos estudos realizados em humanos e cães caracterizam clinicamente e morfologicamente esta doença, (Landman, 2011) com intenção de identificar novos factores de diagnóstico e prognóstico (Espinosa de los Monteros *et al.*, 2000; Esplin, 2008; Sánchez *et al.*, 2007; Schultheiss, 2006).

Quarenta e oito tumores foram avaliados neste estudo, sendo 9 melanocitomas e 39 melanomas, com localizações cutâneas e também na cavidade oral. Estes dados estão de acordo com um outro estudo realizado por Schultheiss (2006) em que numa casuística de 46 neoplasias melanocíticas em cães, encontraram também uma maior prevalência de melanomas (69,5%). Camargo e os seus colaboradores (2008) apresentaram resultados contraditórios quando comparados com os resultados obtidos neste estudo, indicando uma maior prevalência de melanocitomas (67,2%) na espécie canina. No entanto, este estudo foi realizado apenas com neoplasias melanocíticas localizados sobre a pele e os dígitos, desprezando o local principal de desenvolvimento de melanoma, que está localizado na mucosa oral.

Nos tumores melanocíticos, a localização exerce uma influência directa sobre o prognóstico (Spangler & Kass, 2006), fazendo com que os tumores melanocíticos localizados na cavidade oral, junções mucocutâneas e leito ungueal estejam associados a um alto grau de malignidade (Bergman *et al.*, 2003; Bergman *et al.*, 2006), e diminuição da sobrevivência quando comparado com a localização dérmica (Millanta *et al.*, 2002). Os tumores melanocíticos cutâneos normalmente apresentam um comportamento benigno e, por conseguinte, um melhor prognóstico (Smith *et al.*, 2002). Spangler & Kass, (2006) encontraram mortalidade de 68% em cães com melanoma em cavidade oral versus 7% em cães com melanoma de pele. Das nossas 48 amostras em estudo, 29 tinham localização

cutânea, representando 60,4% do total das amostras, enquanto apenas 39,4% constituíram a cavidade oral. Estes resultados contrapõem os estudos realizados por Smith *et al.* (2002) e Spangler & Kass (2006), nas quais os melanomas orais prevaleciam sobre as outras localizações primárias. A mesma relação que existe entre a localização e a agressividade tumoral, não é compartilhada com o tamanho, visto que este não parece influenciar o comportamento tumoral (Spanger & Kass, 2006). A avaliação do tamanho dos tumores obtidos neste estudo variou entre 0,4 cm no mínimo e 9cm de máximo, com uma média de 2,71cm. Estes resultados vão ao encontro do resultado obtido por Ramos-Vara e o seu grupo de investigadores (2000), em que a dimensão máxima de 122 melanomas orais, foi menor do que 1cm em 23 casos (18,8%), 1,1-2 cm em 63 casos (51,7%), 2,1-3 em 32 casos (26,2 %) e maior do que 3,1cm em 4 dos casos (3,3%).

Para além dessas variáveis os tumores melanocíticos podem também ser relacionadas com a raça do animal. No nosso estudo a maioria dos animais pertenciam a raça Boxer, seguido da raça Cocker Spaniel. Estes resultados estão de acordo com os achados de Garma-Avina e a sua equipa (1981), em que a raça Boxer é a raça pura com maior predisposição para desenvolver este tipo de neoplasia. De acordo com Ramos-Vera *et al.* (2000) e Sanchez *et al.* (2007), o Cocker Spaniel está entre as raças em que é mais frequente o aparecimento de melanoma oral (Ramos-vara *et al.*, 2000). Geralmente, a diferença entre os perfis de raça pode simplesmente reflectir as mudanças na popularidade de uma raça em um determinado momento ou reflectir uma população local e seus aspectos culturais (Schultheiss, 2006). De acordo com Modiano *et al.* (1999), a razão de preferência racial não é ainda clara. Todavia, este conceito não é universal na literatura, pois alguns autores tais como Camargo (2005) e Perrone (2001), verificaram maior predisposição em cães da raça Schnauzer.

As neoplasias melanocíticas foram mais prevalentes em animais do genero masculino, representados em 58,3% das amostras, o que também foi observado em uma casuística por Camargo *et al.* (2008) e Teixeira *et al.* (2010). Contudo os resultados obtidos por Perrone, (2001) e Muller *et al.*, (2001) descreveram uma maior prevalência no genero feminino, enquanto outros autores discordam da existência de uma predisposição sexual em neoplasias melanocíticas (Bolon *et al.*, 1990; Ramos-Vara *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2006).

Os animais avaliados clinicamente neste trabalho tinham a idade compreendida entre 1 e os 16 anos, com uma média de 10,53 anos. Verificámos ainda uma tendência dos tumores melanocíticos se desenvolverem em animais mais velhos como é caso dos melanomas orais

que segundo os relatos feitos (Borthwick *et al.*, 1982; Delverdier *et al.*, 1991; Hoyt *et al.*, 1984; Ramos-Vara *et al.*, 2000) afecta na maioria os cães adultos. O melanoma é mais comum em cães velhos com idade média de 9,8 anos (Millanta *et al.*, 2002) a 11,6 anos (Bolon *et al.*, 1990).

Relativamente a morfologia celular, verificámos que nos tumores melanocíticos caninos, células epitelióides foram o tipo celular mais comum em todos os locais (52,1%), enquanto que as lesões mistas foram vistas com menos frequência (25%). As células do tipo fusiforme foram ainda menos frequentes, representando 22,9% das amostras. Dados semelhantes foram encontrados por Millanta *et al.* (2002) com uma prevalência de melanomas epitelióides (31%) em canídeos e por Spangler & Kass, (2006), com uma prevalência de 65,7% do mesmo tipo histológico.

A actividade juncional, no nosso estudo esteve presente em 77,8% dos melanocitomas, visto que é uma das características mais relevantes neste tipo de tumores, (Garma-Avina *et al.*, 1981). Nos tumores malignos, a presença desta característica histopatológica pode surtir um impacto negativo na sobrevida dos animais, como foi constatado por Spangler & Kass (2006).

A atipia nuclear tem sido muito correlacionada com a malignidade nos tumores melanocíticos caninos. (Spangler e Kass, 2006) No nosso estudo a maioria dos tumores orais apresentaram o grau de atipia 3, seguido dos melanomas cutâneos que também mostraram uma certa agressividade, estimada por este parâmetro. De acordo com Spangler & Kass (2006), a atipia nuclear revelou-se a característica histopatológica com maior valor prognóstico no caso dos melanomas orais. Já os melanocitomas, cujo comportamento é benigno, apresentaram na sua maioria grau 1 de atipia.

A Infiltrado linfoplasmocitário e a necrose estiveram presentes em mais de metade das células nos tumores melanocíticos malignos cutâneos e orais e estiveram ausentes em quase todos os melanocitomas. Estes resultados vão ao encontro dos estudos realizados por Spangler & Kass (2006) em que a inflamação profunda e a necrose foram associadas a malignidade do tumor.

O tamanho tumoral também tem sido associado a malignidade do tumor (Spangler & Kass, 2006), facto este que vai ao encontro dos nossos resultados em que 100% dos melanocitomas apresentaram ausência de células gigantes, enquanto os tumores malignos apresentaram um percentagem considerável de células gigantes.

A ulceração esteve ausente em todos os melanocitomas e presente na maioria dos tumores malignos. Como refere Gross *et al.* (2005), a ulceração é incomum nos melanocitomas. Nos melanomas cutâneos humanos, a ulceração constitui um factor de prognóstico reservado (Sarpa *et al.*, 2006).

A presença de células tumorais intracelulares foi uma característica exclusivamente dos tumores malignos, uma vez que uma das evidências absoluta de malignidade é a invasão dos vasos linfáticos ou pequenos vasos sanguíneos (Goldschmidt *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1997).

A quantidade de estroma no nosso estudo foi maioritariamente do grau 2, tendo se verificado principalmente nos melanocitomas, o que não está de acordo com o referido por Garma-Avina *et al.* (1981) e Gros *et al.* (2005) Segundo os mesmos, nas lesões melanocíticas benignas, a quantidade de estroma é, geralmente, escassa. Mas estes resultados podem ser explicados pelo facto de que no nosso estudo o tipo de células predominante nos melanocitomas é epitelióides, enquanto nos referidos estudos encontraram na maioria as células fusiformes. De acordo com Gross *et al.* 2005 os tumores com morfologia celular predominantemente epitelióide apresentam, em geral, maior quantidade de estroma.

Entretanto, é importante ressaltar que tratando-se da análise histopatológica dos melanomas na medicina veterinária, os padrões de prognósticos dos pacientes não estão ainda bem definidos e não seguem os mesmos padrões utilizados pela medicina humana, tais como: o nível de invasão, um factor de prognóstico utilizado em humanos (níveis de Clark ou espessura de Breslow), não se aplica em tumores caninos, pois a maior parte deles encontram-se dentro da derme profunda ou tecido subcutâneo no momento do diagnóstico (Lacroux *et al.*, 2012).

Para além do estudo das características clínicas e histopatológicas, a análise das alterações moleculares é de extrema importância, pois mudanças observadas em células de pacientes com cancro estão relacionadas, principalmente aos mecanismos que regulam a divisão celular (Landman, 2011).

Estudos de expressão de proteínas por imunohistoquímica parecem ser um complemento útil à histopatologia, melhorando o prognóstico do melanoma, fornecendo assim melhores informações para o médico (Laprie *et al.*, 2001). Sabe-se que em humanos e cães a técnica de imunohistoquímica é útil na diferenciação de neoplasias melanocíticas e não melanocíticas, na identificação do grau de malignidade tumoral e classificação das neoplasias de acordo com a marcação imunohistoquímica para anticorpo específico, (Landman, 2011) permitindo a detecção de proteínas associadas a proliferação celular, tanto nas neoplasias humanas, como

na medicina veterinária (Alves *et al.*, 1999; Roels *et al.*, 1999; Suzano *et al.*, 2008), desta forma poder-se-á acrescentar informações importante para a formulação de um prognóstico mais confiável, identificando por meio de marcação histo e imunohistoquímica ou contagem de mitoses a fracção de células em proliferação (Ellis e Whitehead, 1981; Strefezzi *et al.*, 2010). O principal marcador das células em proliferação é o antigénio Ki-67 (MIB-1) (Fournel-Fleury *et al.*, 1997; Kiupel *et al.*, 1999; Suzano *et al.*, 2008).

Desde a sua descoberta, que o Ki-67, dada a sua presença exclusiva na fase activa do ciclo celular, tem sido utilizado em investigações que estudam a relação entre a diferenciação tumoral, estágio tumoral, tamanho do tumor, prognóstico, sexo, idade do doente e a proliferação celular determinada pelo índice de imunomarcação com o Ki-67 (Rew *et al.*, 1993; M Duchrow *et al.*, 2003).

Diversos estudos em humanos descrevem a taxa de proliferação celular mensurada pela expressão de Ki-67 como tendo valor prognóstico em melanomas (Hernberg *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 2009), para além do seu auxílio na distinção entre tumores melanocíticos benignos e malignos (kanter *et al.*, 1995; Kanter-Lewensohn *et al.*, 1997; Sviatoha *et al.*, 2010). Em melanomas malignos, sabe-se que há correlação directa entre a marcação para Ki-67 e a espessura tumoral, potencial metastático e prognóstico (Ramsay *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 1997; Koleem *et al.*, 2000). Em cães, Roels *et al.* (1999), constatou que o Ki-67 pode ser usado como factor prognóstico e de sobrevida para melanomas, sendo correlacionado com o diagnóstico histológico e crescimento invasivo (Roels *et al.*, 1999).

O presente trabalho pretende estudar a fracção de células em proliferação em tumores melanocíticos dos canídeos, demonstrando a importância do anticorpo Ki-67 como indicador prognóstico que prevê exactamente a evolução clínica, permitindo a criação de uma ferramenta que auxilie os clínicos na escolha da opção terapêutica mais adequado a determinado doente.

Neste estudo, a proliferação celular foi determinada, pelo método imunohistoquímico, em 48 secções de tumores melanocíticos caninos incluídos em parafina, através do uso do anticorpo monoclonal MIB-1 que é uma das ferramentas mais utilizadas para a obtenção de informações acerca da cinética celular no material histológico de rotina (De Matos *et al.*, 2006; Laprie *et al.*, 2001; Sarli *et al.*, 2002; Spyrtatos *et al.*, 2002). Apesar deste anticorpo poder ser usado nas amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, o que facilita claramente os estudos da cinética celular numa variedade de tumores, existem factores técnicos, como a fixação, a diluição do anticorpo, os sistemas de detecção, os métodos de pré-

tratamento, a interpretação e os métodos de contagem, que podem influenciar os resultados e causar variações entre os diferentes estudos (Yang *et al.*, 1996).

Como lesões melanocíticas podem conter uma quantidade variável de melanina, o branqueamento é necessário por vezes para uma melhor apreciação da imunoexpressão, mesmo que possa interferir com a reactividade do antigénio celular (Alexander *et al.*, 1986). Nas amostras em que houve marcação a imunorreactividade para a proteína Ki-67 não foi uniforme no tumor, com diminuição do número de células positivas e da intensidade de marcação nas áreas de necrose e ulceração. A reacção foi nuclear, incluindo nas células em mitose.

Semelhante ao estudo realizado por Bergin *et al.* (2011), os núcleos para o Ki-67 foram contados em objectivas de 40X com ajuda de uma ocular com reticula, e as áreas sob a região de ulceração foram evitadas (Smedley *et al.*, 2011). Vários estudos têm demonstrado que o índice de proliferação marcada por Ki-67 tem significado prognóstico para neoplasia melanocíticas canina (Smedley *et al.*, 2011).

Recentemente, tem sido mostrado que o índice proliferativo avaliado por imunohistoquímica pode proporcionar uma precisa previsão do resultado clínico, complementando assim todos os outros métodos disponíveis para prever a malignidade (Spangler & Kass, 2006).

No nosso estudo a média de expressão do Ki-67 em melanomas orais, foi estatisticamente superior à média dos tumores cutâneos. Estes resultados coincidem com o obtido por Millanta *et al.* (2002), em que o MIB-1 foi estatisticamente superior em melanomas orais do que nos cutâneos. Contrariando o relatado feito por Sevastre *et al.* 2012. No nosso estudo foram encontradas diferenças significativas entre a localização dos tumores oral e cutâneos, ou entre diferentes tipos histológicos do tumor.

O aumento da actividade proliferativa de células tumorais também está associado a malignidade e é um factor de prognóstico importante em diversas neoplasias humanas (Linden *et al.*, 1992).

Um estudo realizado em cães, demonstrou que os melanocitomas apresentou uma marcação positiva para o Ki-67 quarto vezes menor que os melanomas malignos (Milantta *et al.*, 2002), no nosso trabalho resultados semelhantes também foram obtidos, os tumores classificados como benignos apresentaram uma média de proliferação muito inferior aos malignos tanto para o Ki-67, bem como o índice mitótico. Estes resultados demonstram que o Ki-67 pode ajudar a diferenciar entre os tumores melanocíticos benigno e maligno, o que está

de acordo com estudos anteriores sobre a utilização do marcador Ki-67 como critério para a previsão do comportamento clínico de melanomas em pacientes humanos (Soyer, 1991; Rieger *et al.*, 1993; Hernberg *et al.*, 1998) em cães e gatos (Roels *et al.*, 1999).

Em humanos, lesões melanocíticas benignas apresentaram marcação positiva para o Ki-67 em zonas superficiais, além de menor índice de proliferação que as lesões melanocíticas malignas (Alonso *et al.*, 2004; Ladstein *et al.*, 2010; Sviatoha *et al.*, 2010), apresentando actividade mitótica independente da reduzida marcação para o anticorpo (Carlson *et al.*, 2009).

Correlacionando os estudos anteriores, tanto em canídeos ou humanos, com os resultados apresentados neste estudo, podemos verificar que baixos índices proliferativos podem estar relacionados com a benignidade das lesões apresentadas. Sendo assim o índice proliferativo pode ser o auxílio mais objectivo para avaliar o grau de malignidade em pacientes com melanomas cutâneos (Laprie *et al.*, 2001).

De acordo com vários estudos anteriores, índices de proliferação superiores a 15%, estão associados a um comportamento maligno dos tumores, funcionando como um limite entre tumores malignos e benignos (Sevastre *et al.*, 2012, Laprie *et al.*, 2001; Lacroux *et al.*, 2012), permitindo uma rápida distinção entre os dois.

O índice mitótico é uma ferramenta rápida e de baixo custo para estimar a proliferação de células tumorais, utilizando metodologias rigorosamente padronizadas. Em ensaios clínicos, a proteína Ki-67 pode ser utilizado em conjunto com o índice mitótico para assegurar uma classificação correcta do tumor na base do potencial proliferativo (Elston *et al.*, 1993; Spyrtos *et al.*, 2002).

Assim como o Ki-67, o índice mitótico também foi muito alto em quase todos os melanomas em estudo, apresentando valores acima do limite de 4 figuras mitóticas /10 campos de grande ampliação (Smith *et al.*, 2002; Schultheiss, 2006; Smendley *et al.*, 2011; Sevastre *et al.*, 2012), enquanto os melanocitomas apresentaram uma média de $12,7 \pm 14,9$ em relação ao Ki-67 e 3,3 figuras mitóticas/10 HPF relativamente ao índice mitótico, este nosso valor para o IM vão ao encontro do valor relatado por Ramos-vara *et al.* (2000). Em um estudo realizado por Bergin *et al.*, 2011, índice mitótico de $\geq 3/10$ HPF teve associação significativa com a diminuição de sobrevivência em pacientes com melanomas orais (Ginn *et al.*, 2007; Withrow & Vail, 2007; Laprie *et al.*, 2001; Smedley *et al.*, 2011). Este limite foi estabelecido empiricamente e associado a pior prognóstico em melanomas orais com diferenciação osteocartilagínea (Sanchez *et al.*, 2007; Bergin *et al.*, 2011; Smedley *et al.*,

2011), enquanto o índice mitótico <3 foi estatisticamente associado a um resultado favorável. (Hahn *et al.*, 1994; Bergin *et al.*, 2011) Assim o índice mitótico foi considerado útil para prever o comportamento maligno e, em alguns, apresentou pouca significância (Spangler & Kass, 2006; Smedley *et al.*, 2011).

O tipo celular não se relacionou com a malignidade do tumor, não apresentando uma associação significativa nem com o Ki-67, nem com o índice mitótico. Este facto foi confirmado por Roels *et al.* (1999), em que não houve indicação qualquer de diferenças significativa na malignidade entre os tipos de células do tumor (Sevastre *et al.*, 2012). Também Millanta *et al.* (2002) não encontrou nenhuma associação entre os tumores malignos e a sobrevivência, confirmando que nestas neoplasias, a malignidade não está relacionada com o tipo de células tumorais.

A proliferação intraepitelial, a actividade juncional e as células tumorais intravasculares não apresentaram associação estatisticamente significativa nem com o índice de proliferação marcada pelo Ki-67 nem com o índice mitótico nos tumores melanocíticos malignos. Dados semelhantes foram encontrados por Sevastre *et al.* (2012) em que também não foram encontradas associações entre a fracção de crescimento e o índice mitótico com linfócitos infiltrantes nem em melanomas orais nem cutâneos, contrariando as evidências descritas por Spangler & Kass (2006) que nos diz que nos tumores malignos, a presença da actividade juncional pode causar um impacto negativo na sobrevida dos animais.

O índice mitótico apresentou uma associação significativa com a necrose nos tumores melanocíticos caninos ($p=0,028$). Sendo ambos indicadores muito importantes de malignidade (Smith *et al.*, 2002; Sevastre *et al.*, 2012), mas no nosso estudo a necrose não se correlacionou com a progressão tumoral. Outros mecanismos poderão estar envolvidos como por exemplo as metaloproteinases.

Um alto grau de atipia nuclear está associada a um mau prognóstico, e pouca ou nenhuma atipia está associado a um prognóstico favorável; (Spangler & Kass, 2006; Bergin *et al.*, 2011). No entanto, a avaliação deste parâmetro está sujeito a variação interobservador, por isso, o grau de atipia nuclear foi avaliado para as neoplasias melanocíticas com base nos critérios descritos por Spangler & Kass (2006), sempre pelo mesmo observador, reduzindo assim as variações interobservador. (Smedley *et al.*, 2011). No nosso estudo a atipia nuclear apresentou sempre uma associação significativa com o Ki-67 em todos os tumores melanocíticos, contrariando o relato feito por Millanta *et al.* (2002) em que o grau de atipia não foi significativos para o Ki-67. A mesma relação não se verifica quando se trata apenas

dos tumores malignos, pois estes mostraram ser significativos apenas com o Ki-67, não mostrando qualquer relação com o índice mitótico. No entanto, Spangler & Kass, (2006) demonstraram o interesse de atipia em melanomas orais caninos, após uma análise de 104 casos. Estes resultados estão de acordo com investigações anteriores que indicam que o Ki-67 pode ser um bom indicador de prognóstico para melanomas malignos caninos (Millanta *et al.*, 2002).

Os autores descobriram que a presença de Infiltrado linfoplasmocitário não foi significativamente relacionado à fracção de crescimento (Millanta *et al.*, 2002). Outro estudo confirmou estes resultados e revelou que o grau de Infiltrado linfoplasmocitário, não têm valor prognóstico para melanomas orais canino. (Hahn *et al.*, 1994). No entanto, no nosso estudo a Infiltrado linfoplasmocitário mostrou ser significativo para o Ki-67 em todos os tumores melanocíticos, com elevadas percentagens de proliferação.

Em um estudo relatado por Smedley *et al.* (2011), a ulceração das neoplasias melanocíticas cutâneas foi associado com um tempo de sobrevivência significativamente menor ($p=0,023$) e foi indicado como um factor prognóstico independente ($p=0,065$) (Laprie *et al.*, 2001). Em contraste, outro estudo não encontrou uma correlação entre ulceração e o desfecho clínico para tumores melanocíticos com localização oral, cutânea ou leito ungueal (Schultheiss *et al.*, 2006; Smedley *et al.*, 2011). No nosso estudo a ulceração apresentou uma correlação significativa nos tumores melanocíticos tanto com o Ki-67 ($p=0,006$) assim como também o índice mitótico ($p=0,002$), permitindo concluir que esta é uma característica associada a agressividade e a capacidade proliferativa dos tumores.

No que diz respeito à correlação entre o Ki-67 e o índice mitótico estes apresentaram uma relação significativa ($p=0,001$) quando se tratava dos tumores melanocíticos, entretanto quando se tratou apenas dos tumores malignos esta significância foi de $p=0,026$. Estes resultados estão de acordo com vários relatos feitos por estudos anteriores, em que foram encontradas uma forte correlação entre a actividade proliferativa determinado pelo Ki-67 e o índice mitótico (Millanta *et al.*, 2002; Laprie *et al.*, 2001; Bergin *et al.*, 2011).

Relativamente ao tamanho do tumor, este não mostrou qualquer significância nem com o índice proliferativo determinado pelo Ki-67 ($p=0,239$) nem com o índice mitótico ($p=0,261$). Entretanto é geralmente aceite que tumores com uma rápida taxa de divisão celular, e logo um aumento mais rápido de tamanho, estarão associados a um pior prognóstico que aqueles com menor grau de proliferação celular (Roels *et al.*, 1999). A idade foi também uma das variáveis que não mostrou significância com o índice de proliferação em nenhum dos casos estudados.

Vários estudos examinaram o nível de infiltração ou invasão de tecidos adjacentes para ser utilizado como factor prognóstico. Quando foram avaliadas apenas melanomas malignos (oral e cutânea) o nível de infiltração do estroma não pareceu estar relacionado com o tempo de sobrevivência do animal (Hahn *et al.*, 1994; Millanta *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2006). Estes relatos estão de acordo com os nossos resultados em que o estroma não mostrou significância com o índice proliferação tumoral.

O melanoma é um tumor com comportamento bastante agressivo, tornando difícil prever o curso clínico apenas por critérios histológicos. Recentemente, tem sido mostrado que o índice proliferativo pode proporcionar uma precisa previsão do resultado clínico, completando assim todos os outros métodos disponíveis para prever a malignidade do tumor.

6. CONCLUSÃO

Na série de neoplasias estudada podemos concluir que a avaliação clínica e as características histopatológicas das neoplasias melanocíticas do cão, estão de acordo com outros trabalhos realizados anteriormente, sendo que no nosso trabalho a raça que se mostrou mais predisposta a desenvolver este tipo de neoplasia foi a raça Boxer. Entre os animais avaliados clinicamente a idade estava compreendida entre 1 e os 16 anos com uma média de 10,53 anos com tendência para estas neoplasias se desenvolverem em animais mais velhos.

O IM foi bem menor nos melanocitomas em relação aos melanomas malignos, independentemente de localização.

A média de expressão do Ki-67 em melanomas orais, foi estatisticamente superior à média dos tumores cutâneos.

A taxa de proliferação tumoral avaliada pelo Ki-67 associa-se com características histopatológicas de agressividade. Tumores melanocíticos benignos apresentaram menor índice de proliferação para o Ki-67 que as lesões melanocíticas malignas.

O índice de proliferação medido pelo Ki-67 correlacionou-se fortemente com o índice mitótico e foi estatisticamente superior em melanomas malignos orais do que em cutâneos.

Com base nesses resultados a actividade proliferativa determinada quer pelo Ki-67, quer pelo IM pode ser um parâmetro adicional para discriminar entre lesões benignas e malignas em tumores melanocíticos.

O IM, em combinação com o índice proliferativo determinado pelo Ki67 e características clínicas, permitirá aumentar a percentagem de neoplasias melanocíticas classificadas correctamente, tornando cada vez mais exacto o prognóstico, auxiliando o médico na escolha no melhor tratamento para o doente.

7. BIBLIOGRAFIA

Alexander, R. A., Hiscott, P. S., Hart, R. I. & Grierson, I. Effect of melanin bleaching on immunoperoxidase, with reference to ocular tissues and lesions. *Medical Laboratory Science*. 1986; 43, 121–127.

Alonson, S.R.; Ortiz, P.; Pollón, M.; Pérez-Gómez, B.; Piris, M.A; Rodriguez-Peralto, J.L. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissues microarray based study. *The American Journal of pathology*. 2004; 164: 193-203.

Alves, V. A. F.; Bacchi, C. E.; Vassalo, J. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: *Sociedade Brasileira de Patologia*, 1999. 270 p.

Akrish S, Buchner A, Dayan D. Oral cancer: diagnostic options as an aid to histology in order to predict patients at high risk for malignant transformation. *Refuat Happen Vehashinayin*, Oct. 2004; 21(4):6-15, 93.

Baba, A.L. Câtoi, C. Comparative oncology. The publishing house of the romanian Academy. 2007.

Bergin, I.L, Smedley, R.C, Esplin, D.G, Spangler, W.L, Kiupel, M Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Veterinary Pathology*. 2011; 48, 41-53.

Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, Wulderk M, Jeffers Y, Sadelain M, Hohenhaus AE, Segal N, Gregor P, Engelhorn M, Riviere I, Houghton AN, Wolchok JD: Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clinical Cancer Research*. 2003 9:1284–1290.

Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, Leibman NF, Craft DM, Leung C, Liao J, Riviere I, Sadelain M, Hohenhaus AE, Gregor P, Houghton AN, Perales MA, Wolchok JD. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the *Animal Medical Center. Vaccine*. 2006;24:4582-85.

Bergman, P. J., DVM, MS, PhD, Canine Oral Melanoma, Clinical Techniques in Small Animal Practice. 2007.

Bergman PJ and Wolchok JD. Of Mice and Men (and Dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy*. 2008; 6: 817-826.

Bolon B., Calderwood Mays M.B. & Hall B.J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Veterinary Pathology*. 1990; 27:96-102.

Borthwick R, Else RW, Head KW: Neoplasia and allied conditions of the canine oropharynx. *Veterinary Animal*. 1982; 22:248–269.

Bronden, L. B. Thomas, E. Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs - data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2009, 51:54.

Brown, D. C., Gatter, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990; 17, 489–503.

Camargo, L.P. Neoplasia melanocítica cutâneas em cães: aspectos clínicos e histopatológicos em 58 casos. Tese de doutoramento. Universidade Federal de Viçosa Minas geral. 2005.

Camargo L.P., Conceição L.G. & Costa P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: Estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). *Braz. Journal Veterinary Research. Animal Science* 2008; 45(2):138-152.

Carlson, J.A.; Ross, J.S.; Slaminski, A.J. New techniques in dermatopathology that, help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clinics in Dermatology*. 2009; 27: 75-102.

Cangul, I.T. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours. *Veterinary Science*. 2001; 4:1-19.

Cuitino , M. C; Massone, A. R.; Idiart, J. R. Idiart. Lack of Prognostic Significance of Angiogenesis in Canine Melanocytic Tumours, *Journal of Comparative Pathology*. 2012, 147, 147e152 .

De Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carvalheira JG, Dos Santos MS, Rutteman GR, Gärtner M de F. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Research*. 2006;26(3A):1821-1826.

Delverdier M, Guire F, Van Haverbeke G: Les tumeurs de la cavité buccale du chien: etude anatomoclinique a partir de 117 cas. *Revue de Medecine Veterinaire*. 1991; 142:811–816.

Fournel-Fleury, C. et al. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of Ki-67 antigen. *Journal of Comparative Pathology*. 1997; 117: 61-72.

Ellis P.S.J. & Whitehead R. Mitosis counting: A need to reappraisal. *Humam. Pathololy* 1981; 12:1-4.

Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 1993;46:189–190.

Espinosa de los Monteros A, Martín de las Mulas J, Fernández A, Orós J, Rodríguez F. Immunohistopathologic Characterization of a Dermal Melanocytoma-Acanthoma in a German Shepard Dog. *Veterinary Pathology*. 2000;37:268-71.

Esplin, D.G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. *Veterinary Pathology*. 2008; 45, 889-896.

Ferreira, C.M.M.; Maceira, J.M.P.; Coelho, J.M.C.O. Analise imunohistopatológica, clinica e evolutiva dos melanomas. *Jornais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de janeiro. 1997; 72: 117-126.

Garma-Aviña A., Valli V.E. & Lumsden J.H. Cutaneous melanomas in domestic animals. *Journal cutaneous Pathology*. 1981, 8:3-24.

Garbe, C. Peris, K. Hauschild, A. Saiag, P. Middleton, M. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer*. 2010, 46, 270-283.

Gerdes J, Becker MHG, Key G. Immunohistological detection of tumor grown fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely processed tissues. *Journal Pathology*, Sept. 1992; 168(1):85-87.

Ginn PE, Mansel JEKL, Rakich PM. Skin and appendages. In: Maxie MG & Jubb KVF eds. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. 5^a ed. *Elsevier -Health Sciences Division*, 2007:599,759-61.

Gould, R.B.E.; Bracken , M.B.; Rimm, D.L. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a Systematic review and meta-analysis. *Journal of the national cancer institute*. 2009; 101: 452-474.

Goldschmidt M.H. & Hendrick M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten D.J. (Ed.), Tumors in Domestic Animals. 4th ed. *Iowa State Press, Ames*. 2002, 45-118

Goldschmidt M.H, Dunstan R.W, Stannerd A.A, von Tscharner C, Walder E.J, Yager J.A. Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals. In: WHO International Classification of Tumors of Domestic Animals. Washington DC: *Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology*, 1998:38-40.

Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J. & Affolter, V.K. Skin diseases of the dog and cat: Clinical and histopathologic diagnosis. (2nd ed.). *Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing*. 2005.

Haass, N.K.; Amalley, K.S.M; Li, L.; Herlyn, M. Adhesion migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell Research*. 2005; 18: 150-159.

Hahn KA, DeNicola DB, Richardson RC, Hahn EA: Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. *Journal of Small Animal Practice*. 1994; 35:251–256.

Hernberg, M.; Turunen, J.P.; Von Boguslowsky, K.; Muhanen, T.; Pyrhonen, S. prognostic value of biomarkers in malignant melanoma. *Melanoma Research*. 1998; 8: 283-291.

Hoyt RF, Withrow SJ: Oral malignancy in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1984; 20:83–92.

Hrabeta J, Jelínek F, Svoboda M, Eckschlager T. Correlation of DNA ploidy with location and type of melanoma in dogs. *Comparative Clinical Pathology*. 2007;16:229-33.

Jones TC, Hunt RD, King NW. Mineral deposits and pigments. In: *Veterinary pathology*. 6^a ed. Wiley-Blackwell, 1997:66-67,856-58.

Kausch, I.; Lingnau, A.; Endl, E.; Sellmann, K.; Deinkert, I.; Rotliff, T.L. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer*. 2003; 105(5): 710-716.

Kanter, L.; Blegen, H.; Wejde, J.; Lagerlof, B.; Larsson, O. Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties. *Melanoma Research*. 1995; 5 :345-350.

Kanter-Lewensohn, I.; Hedblad, M.A.; Wejde, J.; Larsson, O. Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. *Modern pathology*. 1997; 10: 917-920.

Kaleem, Z.; Lind, A.C.; Humphrey, P.A.; Sueper, R.H.; Swanson, P.E.; Ritter, J.H.; Wick, M.R. concurrent Ki-67 and P53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasm: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanoma? *Modern pathology*, 2000; 13: 217-222.

Key G, Pettersen JL, Becker MHG, Duchrow M, Schlüter C, Askaa J, Gerdes J. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin sections. *Journal of Clinical Pathology*, Dec. 1993; 46(12):1080-1084.

Kiupel, M.; Teske, E.; Bostock, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology*, 1999; 36: 292-300.

Ladstein, R.G.; Bachmann, I.M.; Straume, O.; Akslen, L.A. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC cancer*. 2010;10: 140.

Landman, M.L. Expressão de marcadores imunohistoquímicos em neoplasias melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos. Dissertação de mestrado. São Paulo. 2011.

Lacroux, C.; Raymond-Letron, I.; Bourges-Abella, N.; Lucas, M.N.; Deviers, A.; Serra, F.; Degorce-Rubiales, F.; Delverdier, M. Study of Canine Cutaneous Melanocytic Tumours: Evolution of Histological and Immunohistochemical prognostic criteria in 65 cases. *Revue de Medecine Veterinaire*. 2012; 165: 8-9, 393-401.

Laprie C., Abadie J., Armadeilh M.F., Net J.L., Lagadic M., Delverdier M.: Ki-67 epitope immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Veterinary Dermatology*, 2001, **12**: 139-147.

Linden, M.D.; Torres, F.X.; Kubus, J.; Zarbo, R.J. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Americal Journal of Clinical pathology*. 1992; 97: 4-13.

MacEwen, E.G, Kurzman, I.D, Dubielzig, R.R, Everlith K, Madewell ,B.R, Rodriguez C O, Phillips, B, Zwahlen, C.H, Obradovich, J, Rosenthal RC, Fox LE, Rosenberg M, Henry C, and Fidel J Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clinical Cancer Research*, 1999: 5: 4249–4258.

M Duchrow M, Ziemann, T.; Windhavel, V.; Bruch, H-P.; Broll, R. Colorectal carcinomas with high MIB-1 labeling indices but low PKi-67 mRNA levels correlate with better prognostic outcome. *Histopathology*. 2003; 43: 566-574.

Millanta, F. ; Fratini, F. ; Corozza, M; Castognoro, M. Zappulli, V. Poli, A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behavior. *Research in Veterinary Science*, 2002: 73: 45–51.

Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J: The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *Journal of Veterinary International Medicine*. 1999; 13: 163–174.

Moura, S.A.; Catão,M.H.; Gerbi, M.; Beltao, R.V. Biologic Markers in Oral Cancer. *International Journal of Dentistry*. 2006; 1(2): 59-62.

Moran S, Johnson RP, Kreplin CMA. Malignant Melanoma Involving the Aorta in a Dog. *Canadian Veterinary Journal*. 1983;24:148-49.

Muller, R.M.; Scott, D.W.; Griffin, C.E. Muller e Kirk's *Small Animal Dermatology*. 6.ed. Philadelphia: 2001.

Perrone, E.A. Análise histológica e imunohistoquímica da proliferação celular de neoplasias melanocíticas cutâneas caninas: estudo retrospectivo.. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. 2001.

Philips KA, Andrulis IL, Goodwin PJ. Breast carcinoma arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2: are they prognostically different? *Journal of Clinical Oncology*, 1999; 17:3653-3663.

Ramsay, J.A.; Trom , L.; Iscoe, N.A.; kahn, H.J. MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *The journal of investigative Dermatology*. 1995; 105: 22-26.

Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard A. & Kottler S.J. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 Cases. *Veterinary Pathology*. 2000: 37:597-608.

Rew D.A. Cell proliferation, tumor growth and clinical outcome: gains and losses in intestinal cancer. *Annals of the Royal college of Surgeons of England*. 1993; 75: 397-404,

Rieger, E., Hofmann-wellenhof, R., Soyer, H. P., Kofler, R., Cerroni, L., Smolle, J. & Kerl, H. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen PCNA and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. *Journal of Cutaneous Pathology*. 1993; 20, 229–236.

Roels S, Tilmant K, Ducatelle R. DNA PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology*. 1999; 121(1):13-24.

Sanchez J, Ramirez GA, Buendia AJ, Vilafranca M, Martinez CM, Altimira J, Navarro JA: Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. *Veterinary Pathology*. 2007; 44:676–682.

Sarpa HG, Reinke K, Shaikh L, Leong SPL, Miller JR, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M. Prognostic Significance of Extent of Ulceration in Primary Cutaneous Melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2006;30:1396-1400.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002;14:25- 34.

Sevastre, B.; Taulescu, M.; Sarpataki, O.; Bedecian, I.; Stefan, A.C.; Marcus, I.; Cătoi, C. Imunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms and prognostic evolution of Ki-67 expression. *Bulletin UASMV, Veterinary Medicine*. 2012; 69:1-10.

Suzano, S.M.C.; Sequeira, J.L.; Pessoa, A.WP.; Porto, C.D.; Oliveira, D.E. proliferação celular nos linfomas caninos. *Braz. J. Veterinary Research*. 2008; 45: 313-319.

Scully, C., Field, J. K., Tanzawa, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology*. 2000; 36(3):256-63.

Schultheiss, P.C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2006; 18:422-425.

Spangler WL & Kass PH. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology*. 2006; 43:136-49.

Spyratos F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, Hacène K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, Le Doussal V. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*. 2002; 94(8):2151-2159.

Smedley, R, et al. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Veterinary Pathology*, 2011; 54-70.

Smedley, R. C. Lamoureux, J. Sledge, D.G, Kiupel, M. Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*. 2011; 48: 54-72.

Smith, S.H., Goldschmidt, M.H. & McManus, P.M. A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*. 2002; 39:651-678.

Soyer, H. P. Ki 67 immunostaining in melanocytic skin tumors. Correlation with histologic parameters. *Journal of Cutaneous Pathology*. 1991; 18: 264–272.

Strefezzi, R.F.; Kleeb, S.R.; Xavier, J.G.; Dias, J. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. *Veterinária Brasileira*. 2010; 30(7): 559-565.

Sviatoha, V.; Tani, E.; Kleina, R.; Sperga, M.; Skoog, L. Immunohistochemical analysis of the S100 A1, S100 B, CD44 and Bcl-2 antigens and the rate of cell proliferation assessed by Ki-67 antibody in benign and malignant melanocytic tumours. *Melanoma Research*. 2010; 20:118-125.

Teixeira, T. F., Silva, T.C., Cogliati, B., Nagomi, M.K., Dogli, M. L. Z. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2010; 3(2), 100-104.

Wakamatsu A, Simões AB, Kanamura CT, et al. Manual de Imuno-Histoquímica com menções à técnica de hibridização molecular. *Sociedade Brasileira de Patologia*, 1995: 99.

Wilcock BP & Jr Peiffer BP. Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs. *Veterinary Pathology*. 1986;23:418-24.

Withrow SJ & Vail DM. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: Withrow & McEwen's small animal clinical oncology. 4^a ed. *Elsevier Health Sciences*, 2007:389-93.

Vogt, T.; Zipperer, K.H.; Vogt, A.; Holzel, D.; Landth. Oler, M.; Stolz, W. P53-protein and Ki-67 antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the Skin. *Histopathology*. 1997; 30: 57-63.

Yang W-I, Efird JT, Quintanilla-Martinez L, Harris NNL. Cell Kinetic Study of Thymic Epithelial Tumors Using PCNA (PC10) and Ki-67 (MIB- I) Antibodies. *Human Pathology*. 1996;27:70-76.

